

Doktori (PhD) értekezés tézisei

***Microcystis* fajok toxicitásának
vizsgálata terepi és laboratóriumi
körülmények között**

Ujvárosi Andrea Zsuzsanna

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Bevezetés

Az édesvizekben megjelenő cianobakteriális vízvirágzások száma az utóbbi évtizedekben világszerte megnövekedett, amelyhez a felszíni vizek eutrofizációja nagymértékben hozzájárult. A toxikus vízvirágzások gyakori alkotója a *Microcystis* genusz. Óriási változatosság jellemzi a *Microcystis* fajok által termelt biológiailag aktív szekunder metabolitokat, amelyek közül a mikrocisztinek (MC) a legelterjedtebb cianotoxin csoport. Egy másik csoport, a mikrogininek (MG) szintén megjelennek vízvirágzásokban az MC-ekkel együtt, amelyek toxicitása általánosságban sokkal alacsonyabbnak vélt (Janssen, 2019).

A mikrocisztinek ciklikus heptapeptidek, és jellegzetes Adda (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoiksav) aminosavat tartalmaznak. Az eukarióta protein foszfatáz 1 és 2A inhibitorai. Indukálják az intracelluláris reaktív oxigéngyökök (ROS) képződését, amely lipid, protein és DNS peroxidációt okoz (Pham és Utsumi, 2018; Štern és mtsai., 2019). A víztérben perzisztens metabolitok. Az MC-k jelen vannak a vízi táplálékláncban, azonban a magasabb trofikus szinteken (pl. puhatestűek, kételtűek, halak, madarak) is ártalmasnak bizonyultak. Megfigyelték, hogy képesek akkumulálódni a fito- és zooplanktonban, valamint a növényi és állati szövetekben egyaránt (Pham és Utsumi, 2018).

A mikrogininek (MG) lineáris peptidek, melyekre jellemző az Ahda (3-amino-2-hidroxi-dekánsav) csoport, és a C-terminálison 3-5 további aminosav állhat (Ishida és mtsai., 1998), azonban 3-4 aminosavból álló

variánsokat is leírtak már (Sano és Kaya, 1997; Stewart és mtsai., 2018). A mikroginin termelést világszerte leírták cianobaktérium izolátumokból, de a természetben detektált koncentrációjáról ($\leq 2,21 \mu\text{g L}^{-1}$) eddig mindössze egy tanulmány számolt be (Beverdorf és mtsai., 2017). Toxicitásukról kevés ismeret áll rendelkezésre. Akut toxicitásukról gerinctelen és hal lárva modell szervezeteken számoltak be (Bober és Bialczyk, 2017; Lenz és mtsai., 2019; Fernandes és mtsai., 2019). Jellemzően cink-metalloproteáz inhibitorok, főleg angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) és aminopeptidáz (APM, LAP) gátló aktivitásuk ismert (Ishida és mtsai., 2000; Sano és mtsai., 2005; Lodin-Friedman és Carmeli, 2018).

A dolgozat két részből áll, amely a *Microcystis* fajok által termelt metabolit csoportokat tanulmányozza. Az első rész az MC-k toxicitását vizsgálja terepi körülmények között, míg a második rész, az MG-k káros hatásait kutatja *in vitro* tesztrendszerekben. A munka áttekinti a mikrocisztinek és a mikrogininek toxicitását molekuláris és sejtszinten, valamint a növényi szövetekben.

Célkitűzések:

1. Terepi körülmények között egy hazai eutróf vízterben megjelenő mikrocisztin termelő fajok megfigyelése, és a toxintermelés dinamikájának, a toxin variabilitásának a vizsgálata 3 éven keresztül.
2. A extracelluláris (víztér) és intracelluláris (fitoplankton) mikrocisztin tartalom meghatározása a

vízvirágzások során. A fitoplankton biomassa toxicitásának vizsgálata *in vitro* növényi rendszerben.

3. A vízvirágzásnak kitett környezetből gyűjtött *Ceratophyllum submersum* vízi makrofita *in situ* bioakkumulációs potenciáljának vizsgálata.

4. Laboratóriumi körülmények között fenntartott *Microcystis* izolátumok oligopeptid mintázatának vizsgálata és oligopeptid monokomponensek tisztítása kromatográfiás és tömegspektrometriás módszerekkel.

5. *Microcystis* izolátum kivonatok növényi növekedésre kifejtett hatásának *in vitro* vizsgálata és összevetése egy mikrocisztin termelő törzssel.

6. *Microcystis* izolátumok kivonatának és tisztított mikroginin típusú monokomponensek citotoxikológiai és genotoxikológiai hatásainak vizsgálata, elemzése és összevetése mikrocisztin-LR és cilindropermopszin cianotoxinok hatásaival a metabolikusan aktív, humán HepG2 sejtvonalon.

Anyag és módszer

A Bárdos-tóból (Gyula) 2011-2013 között gyűjtöttünk fitoplankton és vízmintát a vízvirágzásos területről és egy attól távol eső, sejtmentes kontroll területről. A *Ceratophyllum submersum* mintákat 2012-ben gyűjtöttük. A cianobaktérium fajokat Komárek és Anagnostidis (1998) alapján azonosítottuk fénymikroszkóp segítségével.

A *Microcystis* B-14-01 törzs és F-14/9-S12-4-A-01 törzs izolátumokat nitrát tartalmú Allen (Allen, 1968) tápoldatban (5% CO₂ tartalmú sűrített levegő,

buborékoltatás, $26\pm 1^\circ\text{C}$, $100 \text{ lu m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) neveltük. A sejteket aratás után liofilizáltuk.

A liofilizált Bárdos-fitoplankton minták extrakciója bidesztillált vízzel történt, míg a liofilizált Bárdos-víz mintákat bidesztillált vízben oldottuk. A *Ceratophyllum submersum* növényminták extrakciója 99,8% metanollal történt, melyet oldószermentesítés után bidesztillált vízben oldottunk a mérésekhez. Kivonatainkat ELISA és mustár csíranövényteszt mérésekhez használtuk.

A B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 liofilizált sejtekből metanolos (99,8%) kivonatot készítettünk. Az LC-MS mérésekhez, és humán sejt kultúrán végzett kísérletekhez a kivonatot etanolban (50%), a mustár csíranövényteszthez steril ultratiszta vízben oldottuk.

A liofilizált sejtekből metanolos (99,8%) kivonatot készítettünk Vasas és mtsai. (2006) alapján kisebb módosításokkal. Az MC tartalmú Bárdos-minta tisztítása DEAE-cellulóz (DEAE-52) oszlop kromatográfiával történt. Az MG tartalmú B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 izolátumokból történő MG tisztítást több lépésben, DEAE-cellulóz, Toyopearl HW-40, C18 flash kromatográfiás és C18 HPLC oszloptöltetek segítségével végeztük Vasas és mtsai. (2002, 2013) és Bober és mtsai. (2011) alapján kisebb módosításokkal.

Az MC variánsok azonosítása a tisztított Bárdos-mintából MALDI-TOF módszerrel történt (Vasas és mtsai., 2013). Az MG tartalmú kivonatok metabolit mintázatát és az MG variánsok aminosav szekvenciáját LC-ESI-MS tömegspektrometriás módszerrel (Riba és mtsai., 2019) határoztuk meg.

A fitoplankton (intracelluláris MC), sejtmentes vízminták (extracelluláris MC) és *Ceratophyllum*

*submersum*ban akkumulált MC tartalmat ELISA teszttel határoztuk meg a gyártó utasításai szerint (Enzo Life Sciences; ALX-850-319-KI01).

A DNS izolálása fenolos-kloroformos módszerrel történt, míg a *Microcystis* és *Planktothrix* specifikus *mcy* gének vizsgálatát PCR-rel és agaróz gélelektroforézissel végeztük (Farkas és mtsai., 2014).

A Bárdos-fitoplankton kivonatok, valamint a B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 törzs kivonatok fehér mustár (*Sinapis alba* var. budakalászi sárga) csíranövényekre gyakorolt növekedésgátló aktivitását a Kós és mtsai. (1995) és Vasas és mtsai. (2002) alapján kidolgozott módszerrel (BGST) végeztük kisebb módosításokkal.

A humán hepatocelluláris karcinóma (HepG2) sejteket 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú termosztátban tenyésztettük, Williams' E médium, 15% FBS (foetális borjú szérum), 2 mM L-glutamin és 100 U mL⁻¹ penicillin/sztreptomycin tartalmú sejtmediumban. Pozitív kontrollként a prokarcinogén benzo(a)pirént, a DNS szintézis inhibitor etopozidot, és a mikrocisztin-LR (MC-LR) és cilindropermopszin (CYN) cianotoxinokat alkalmaztunk.

A B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 törzs kivonatok és a tiszta mikrogininek hatását a citotoxicitásra és sejtproliferációra az MTT teszttel a Mosmann (1983) által leírt módszer alapján, Žegura és mtsai. (2008) módosításaival mértük 24 és 72 órás expozíciót követően. A sejtek viabilitását az oldószer kontrollhoz (0,1% etanol tartalmú médium) viszonyítva határoztuk meg.

A cianobakteriális kivonatok és mikrogininek hatását a DNS száltörések indukciójára 4 és 24 órás expozíciót

követően a comet assay-vel vizsgáltuk (Singh és mtsai., 1988; Žegura és mtsai., 2004).

A cianobakteriális kivonatok és MG-k hatását a DNS duplaszálú törések indukciójára a γ H2AX assay-vel mértük 24 és 72 órás expozíciót követően anti-H2AX pS139-FITC antitest segítségével áramlási citométerrel (Hercog és mtsai., 2019).

A cianobakteriális kivonatok és MG-k hatását a genomi változások indukciójára a citokinézis-blokkolt mikronukleusz teszttel (CBMN) vizsgáltuk 24 órás expozíció után, a sejtek fixálását Štraser és mtsai. (2011) alapján végeztük és a kiértékelés Fenech (2000) kritériumai szerint történt.

Eredmények

I. Terepi tanulmány – Bárdos-tó

A Bárdos-tóban a 2011 és 2013-as évek során a *Planktothrix agardhii* volt nagyobb arányban a vízvirágzásban, azonban a 2012. augusztusi vízvirágzásban *Microcystis sp.* dominált.

Az MC génklaszterek vizsgálatakor a *Microcystis sp.* specifikus vizsgált összes gént (*mcyA-E, G*) detektáltuk a 2011.08.03., a 2012.08.22., és 2013.08.26. mintákból. A *Planktothrix sp.* specifikus génklaszter elemei közül csupán az *mcyT* gént detektáltuk az összes minta esetében. Eredményeink azt mutatták, hogy az *mcy+/mcy-* genotípusú *Microcystis* populációk relatív aránya eltért a három év során, és az *mcy+* genotípus a 2012-es évben szaporodott el a legnagyobb mértékben a környezetben.

A 2012-es *Microcystis* vízvirágzásból négy mikrocisztin variánst azonosítottunk: MC-LR, MC-YR, [Dha7] MC-RR és MC-LY, mely variánsok a környezetben gyakran jelennek meg.

Az extracelluláris mikrocisztin tartalom vizsgálatokor, a kontroll területen nem mutattunk ki mikrocisztint 2012 augusztusában, azonban a vízvirágzás területéről származó sejtmentes vízmintából $7,31 \pm 0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ MC koncentrációt mértünk. A vízvirágzás területéről származó fitoplankton minták 2012 augusztusában $4,959 \mu\text{g mg}^{-1}$ és 2013 augusztusában $0,449 \mu\text{g mg}^{-1}$ koncentrációban tartalmaztak intracelluláris MC-t. A többi mintavételi időpont esetében nem tartalmazott detektálható mennyiségű MC-t a fitoplankton kivonat.

Az extracelluláris MC *in situ* bioakkumulációját *Ceratophyllum submersum*-ban vizsgáltuk. A 2012-es évben a víztér egy távol eső kontroll és egy vízvirágzásos területről gyűjtöttünk az ott jellegzetes *C. submersum* vízi makrofitából mintákat. A teljes MC koncentrációt a vízvirágzás területéről származó *C. submersum* mintában $1,01 \pm 0,21 \mu\text{g szt. g}^{-1}$ -nak határoztuk meg, míg a kontroll területéről gyűjtött mintában $0,05 \pm 0,03 \mu\text{g szt. g}^{-1}$ MC koncentrációt mértünk.

A vízvirágzások növényi növekedésre gyakorolt hatását *in vitro* rendszerben is tanulmányoztuk. A 2012. augusztusi vízvirágzás kivonat volt a legtoxikusabb, $3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentrációban jelentősen gátolta a növekedést, (IC_{50} $2,145 \text{ mg mL}^{-1}$). A 2013. augusztusi minta kevésbé bizonyult toxikusnak, azonban $6,4 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentrációban jelentős növekedésgátlást (IC_{50} $5,678 \text{ mg mL}^{-1}$) eredményezett. A két kivonat általi gátlás a koncentráció függvényében változott, a többi vizsgált

kivonat azonban nem volt jelentős hatással a csíranövények növekedésére.

II. tanulmány – *In vitro* oligopeptid vizsgálatok

Két *Microcystis* izolátummal (B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 törzs) dolgoztunk. Ezen törzsek teljes kivonatából kiderült, hogy több mikroginin (MG) variánst termelnek, amelyek kivonatban meghatározott arányát MG standardok hiányában a kromatogramon kapott teljes csúcs alatti terület százalékos arányában határoztuk meg LC-MS-sel. A B-14-01 cianobakteriális kivonatban az LC-ESI-MS/MS fragmentációs mintázat alapján MG 565 (8,98%; Ahda-Thr-Pro-Tyr), MG FR3 (21,08%; Ahda-Thr-Pro-Tyr-Tyr), cyanostatin B (51,51%; Ahda-Tyr-Melle-Pro-Tyr), MG GH787 (17,35%; ClAhda-Tyr-Melle-Pro-Tyr) variánsokat azonosítottunk, és egy MG-szerű metabolitot, az MGL 402 variánst (1,02%; Ahda-Thr-Pro) elsőként írtuk le. Az F-14/9-S12-4-A-01 törzs hasonló metabolit összetétellel rendelkezett, ennek kivonatából 3 variánst azonosítottunk: cyanostatin B (68,11%), MG GH787 (29,32%) és MG FR3 (2,57%). A kromatográfias tisztítás így közel egyforma módszerrel zajlott, kisebb módosításokkal, és a tisztítási hatékonyság végül a tisztított komponensekre 17,51 mg összteomet adott 70 g liofilizált sejtéből.

A B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 törzs kivonatok növekedésgátló aktivitásának vizsgálatához pozitív kontrollként az ismert, gátló hatású MC termelő, *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 törzset (Debreceni Egyetem Növénytani Tanszék, törzsgyűjtemény; Vasas és mtsai., 2006) használtuk. A B-14-01 törzs kivonat

jelentősebb, biológiailag releváns növekedésgátlást okozott $\geq 3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentrációban (IC_{50} $16,217 \text{ mg mL}^{-1}$), míg az F-14/9-S12-4-A-01 kivonatnak erősebb gátló hatása volt (IC_{50} $5,5 \text{ mg mL}^{-1}$), statisztikailag szignifikáns aktivitást $\geq 3,2 \text{ mg mL}^{-1}$ mértünk. Megfigyeltük az MG tartalmú kivonatok esetében a $0,8\text{-}1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentrációk enyhe növekedésserkentő hatását. A BGSD 243 törzs gátló hatása koncentrációfüggően változott (IC_{50} $0,076 \text{ mg mL}^{-1}$). Eredményeink elsőként igazolták az MG tartalmú cianobakteriális kivonatok növekedésgátló aktivitását.

A cianobakteriális kivonatok és tiszta MG-k hatását a HepG2 sejtek viabilitására és proliferációjára 24 és 72 órás expozíciót követően határoztuk meg. A B-14-01 kivonat jelentősen csökkentette a viabilitást 24 óra után, kb. 14% és 33%-kal $6,25$ és $10 \text{ } \mu\text{g szt. mL}^{-1}$ koncentrációkban (IC_{50} $214,8 \pm 1,19 \text{ } \mu\text{g szt. mL}^{-1}$). Az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat toxikusabbnak bizonyult 24 órás expozíciót követően (IC_{50} $58 \pm 2,07 \text{ } \mu\text{g szt. mL}^{-1}$), 30%-kal csökkentette a HepG2 sejtek viabilitását $6,25 \text{ } \mu\text{g szt. mL}^{-1}$ koncentrációban. A tiszta MG-k nem voltak hatással a sejtleletképessegre a vizsgált koncentrációkban az oldószer kontrollhoz képest. A 72 órás expozíció után a B-14-01 kivonat koncentráció függő módon csökkentette a HepG2 sejtek proliferációját (IC_{50} $211,5 \pm 1,05 \text{ } \mu\text{g szt. mL}^{-1}$). Azonban az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat kevésbé bizonyult toxikusnak (IC_{50} $279,08 \pm 3,92 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$). A legerősebb MG variáns az MGL 402 volt, kb. 22 és 42%-os viabilitás csökkenéssel 50 és $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban 72 órás expozíciót követően. Az MG FR3 kevésbé volt citotoxikus, 23 és 20%-os csökkenést figyeltünk meg 50 és $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$

koncentrációkban. Az MG GH787 és cyanostatin B variánsok jelentősen csökkentették a sejtproliferációt 25%-kal $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban, azonban a legmagasabb vizsgált koncentrációban ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) az MGL 402 variánshoz képest alacsonyabb aktivitást, 32% és 30%-os csökkenést mértünk az MG GH787 és cyanostatin B variánsoknál. Az MG 565+cyanostatin B komponensek együttes hatására egyedül $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban figyeltünk meg szignifikáns, 32%-os csökkenést, azonban a magasabb koncentrációkban nem volt jelentős eltérés a kontrollhoz képest. Az MC-LR ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) és CYN ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) toxinok esetében 24 órát követően nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést a HepG2 sejtek viabilitásában, ellenben 72 óra elteltével a CYN jelentősen, kb. 55%-kal csökkentette a proliferációt a kontrollhoz képest, míg az MC-LR nem volt hatással a proliferációra.

A comet assay-ben 4 és 24 órás expozíciót követően a B-14-01 kivonat koncentráció és idő függő módon $\geq 0,01 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$ koncentrációban növelte a DNS károsodás mértékét, és az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat alacsonyabb aktivitással, $\geq 0,1 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$ koncentrációban indukálta a DNS száltörések képződését. 4 órás kezelés után a cyanostatin B, MG 565+Cyanostatin B, MG GH787 és MG FR3 statisztikailag szignifikánsan növelte a DNS száltörések képződését $\geq 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, míg az MGL 402 variáns $\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban. A 24 órás expozíciót követően a kontrollhoz képest az MGL 402 szignifikánsan ($\geq 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) indukálta a DNS száltöréseket, így a legerősebb genotoxikus potenciált figyeltük meg ennél a variánsnál. Míg a cyanostatin B és MG GH787 variánsok $\geq 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban, az

MG FR3 indukálta a legkisebb mértékben ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) a DNS száltörések képződését. Az MG 565+cyanostatin B-vel kezelt sejtek 4 óra után $\geq 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, 24 óra után $\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentrációban indukáltak DNS száltöréseket statisztikailag szignifikánsan, tehát a 24 órás expozíciót követően alacsonyabb genotoxikus aktivitást figyeltünk meg, mint a cyanostatin B variáns esetében önállóan. Vizsgálataink során a CYN ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) hatására (4 és 24 óra) statisztikailag szignifikáns mértékű DNS károsodást figyeltünk meg.

A 24 és 72 órás expozíció után a B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 cianobakteriális kivonatok ($1 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$) és tiszta MG-k ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) nem indukálták a γH2AX fókuszok számának emelkedését a kontrollhoz képest, azaz nem indukáltak DNS kettős száltöréseket.

A B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 cianobakteriális kivonatok ($1 \mu\text{g szt. mL}^{-1}$) és MGL 402, MG FR3, cyanostatin B, MG 565+cyanostatin B, MG GH787 variánsok ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) hatását a HepG2 sejtek genomi instabilitására 24 órás expozíciót követően határoztuk meg. A B-14-01 kivonat nem volt hatással az MNed sejtek (mikronukleuszt tartalmazó binukleáris sejtek), MNi (mikronukleuszok) és NBUD (nukleáris rügyek) gyakoriságára, azonban az NPB (nukleoplazmahidak) gyakorisága ≥ 2 -szeres volt a kontrollhoz képest. Az F-14/9-S12-4-A-01 kivonat hatására statisztikailag szignifikánsan nőtt az MNed sejtek és MNi gyakorisága, habár a válasz kisebb, mint 2-szeres volt, és az NPB és NBUD gyakoriságára nem volt hatással kivonat. A tiszta MG-k közül csak az MG GH787 variáns indukált szignifikáns pozitív, ≥ 2 -szeres MNed sejt, MNi és NPB gyakoriságot a kontrollhoz képest. A cyanostatin B,

MGL 402 és MG FR3 hatására szignifikánsan nőtt az MNed sejtek és az MNi gyakorisága, azonban ez az emelkedés kisebb, mint 2-szeres volt. Továbbá a cyanostatin B variáns, amely szerkezetileg nagyon hasonló az MG GH787-hez (klórozott cyanostatin B), jelentősen, 1,7-szeresen növelte az MNi gyakoriságát, tehát hatással volt a genomi instabilitás indukciójára a HepG2 sejtekben. Az MG 565+cyanostatin B metabolitok egyedül az NPB gyakoriságát növelték, tehát együttes hatásuk eltért a cyanostatin B hatásától. Ez a megfigyelés szintén összhangban van a DNS száltörések indukciója során, a két MG variáns együttes hatására tapasztalt kisebb mértékű DNS károsodással. A citokinézis-blokkolt proliferációs index (NDI) értéke nem csökkent a cianobakteriális kivonatok és mikrogininek hatására. A cianotoxin kontroll CYN hatására az NBUD gyakoriság szignifikáns, biológialilag pozitív emelkedését detektáltuk, amellel növelte az MNed sejtek és az MNi gyakoriságát ≥ 2 -szeresen, és az NDI értékét a HepG2 sejtekben statisztikailag szignifikánsan csökkentette.

Összegzés

A terepi tanulmány a kutatócsoportunk előzetes megfigyelésein alapult, amely szerint a *Microcystis* alkotta vízvirágzás a 2000-es évek elején óriási mennyiségű MC-t termelt. Komplex környezeti tanulmányunkban 3 éven keresztül (2011-2013) vizsgáltuk a víztérben előforduló és valós élettérben lejátszódó jelenségeket. A Bárdos-tóban 2012 augusztusában *Microcystis* sp. domináns vízvirágzást figyeltünk meg, míg a 2011-es és 2013-as években a

Plankothrix agardhii volt a fő vízvirágzást alkotó faj. A bioszintézis génklaszter analízissel bizonyítottuk a *mcy+* genotípusú populációk jelenlétét, és hogy a *Microcystis sp.* volt felelős az MC termelésért 2012 augusztusában. A 2012. augusztusi toxikus vízvirágzás során gyakori MC variánsokat azonosítottunk. A cianotoxin koncentrációk erősen korreláltak a mustár csíranövénytesztben megfigyelt toxicitással, melyben a 2012. augusztusi kivonat gátolta a növekedést a legerősebben. A *Ceratophyllum submersum* alámerülő vízi makrofita magas koncentrációban akkumulált MC-t a toxikus vztérben. A növényi szövetekben való toxin felhalmozódás és a vztérben mért toxin koncentrációk ismeretében pontosabb képet kapunk a MC bioakkumulációs folyamatairól. Ez fontos, ugyanis a legtöbb MC bioakkumulációs tanulmány laboratóriumi körülmények között zajlik, ahol a kísérletek során a külső környezeti tényezők alig vagy egyáltalán nem érvényesülnek. A valós környezetben megfigyelt MC toxin akkumuláció a vztérben élő *Ceratophyllum submersum*ban igazolta, hogy az MC hosszú időn át a vztérben marad, és a toxin akkumulációja révén a sejtszintű folyamatokra is káros hatással lehet. Eredményeink rámutattak annak jelentőségére, hogy több olyan tanulmányra van szükség, ahol a toxikus vízvirágzásokhoz kapcsolódóan a valós környezetben lezajló folyamatokat átfogóan vizsgálják.

A második tanulmány háttérében olyan *Microcystis* laboratóriumi izolátumokkal dolgoztunk, amelyek mikroginin termelők. Munkánk során pontosabb képet kaptunk az MG-k toxicitásáról, humán sejt kultúrák és növényi tesztrendszerekben. Munkánk során két hasonló

oligopeptid mintázattal rendelkező *Microcystis* izolátumból azonosítottunk és tisztítottunk MG FR3, MGL 402, MG 565, MG GH787 és cyanostatin B variánsokat, amelyek közül az MGL 402 variánst elsőként írtuk le. A *Sinapis alba* csíranövény tesztrendszerben végzett vizsgálatunkkal először igazoltuk az MG tartalmú cianobakteriális kivonatok növényi növekedésgátló aktivitását, amelyek az MC tartalmú kivonathoz képest kisebb gátlást indukáltak. A HepG2 sejtvonalon végzett vizsgálataink során az MG tartalmú cianobakteriális kivonatok és tiszta MG-k kisebb mértékű citotoxicitását figyeltük meg. Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a HepG2 sejtekben a cianobakteriális kivonatok és mindegyik vizsgált MG variáns DNS károsodást indukál. Igazoltuk, hogy a cianobakteriális kivonatok és tiszta mikrogininek 4 és 24 órás expozíciót követően DNS száltöréseket indukáltak, azonban 24 és 72 órás expozíciót követően sem indukálnak DNS kettős száltörést. Bizonyítottuk, hogy egyes MG variánsok a genomi instabilitásra is hatással vannak, illetve a cianobakteriális kivonatok hasonló aktivitást mutattak a kivonatban domináns MG variánsokkal. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a mikrogininek veszélyt jelenthetnek a vízi ökoszisztémára és az emberre egyaránt. Az emberi szervezetben a genotoxikus metabolitok olyan súlyos krónikus betegségek kialakulásával hozhatók összefüggésbe, mint a karcinóma, míg a vízi környezetben a vízi szervezetek reprodukciós képességére vannak káros hatással. Jelen tanulmány tanulsága, hogy az MG-k potenciális káros hatásainak vizsgálata időszerű és szükséges, mivel még

nem áll rendelkezésre elég információ, hogy a környezeti és közegészségügyi kockázatot felmérjük.

Új tudományos eredmények

- Komplex környezeti tanulmányban igazoltuk, hogy az eutróf vízterben (Bárdos-tó) a környezeti mintákban *mcy+* genotípusú populációk előfordulnak, és alátámasztottuk, hogy a vízterben megjelenő vízvirágzásokban a mikrocisztin termelésért a *Microcystis sp.* a felelős.
- A környezeti tanulmányban az eutróf vízterben jelentős mennyiségű intracelluláris és extracelluláris mikrocisztint mutattunk ki. Bizonyítottuk, hogy a toxikus vízterben egyértelműen megvalósult a MC bioakkumulációja az ott élő *Ceratophyllum submersum* alámerülő vízi makrofitában, mely magas koncentrációban akumulálta a toxint.
- Elsőként írtuk le az MGL 402 mikroginin variánst.
- Igazoltuk, hogy mikroginin tartalmú cianobakteriális kivonatok, valamint tiszta mikrogininek hatással vannak a HepG2 sejtek viabilitására és proliferációjára.
- Elsőként írtuk le a B-14-01 és F-14/9-S12-4-A-01 mikroginin tartalmú cianobakteriális kivonatok és az MGL 402, MG FR3, cyanostatin B, MG GH787, MG 565+cyanostatin B tiszta mikrogininek genotoxikus aktivitását HepG2 sejteken. Bizonyítottuk, hogy indukálják a DNS száltörések képződését, azonban a DNS kettős száltörések képződését nem.

- Kimutattuk, hogy a MG GH787 és cyanostatin B variánsok, és a B-14-01 kivonat hatással vannak a genomi változások indukciójára HepG2 sejtekben.
- Igazoltuk a mikroginin tartalmú cianobakteriális kivonatok növekedésgátló hatását *Sinapis alba* csíranövénytesztben.



Nyilvántartási szám: DEENK/339/2019.PL
Tárgy: PHD Publikációs Lista

Jelölt: Ujvárosi Andrea Zsuzsanna
Neptun kód: H6TCFM
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10045481

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

1. **Ujvárosi, A. Z.:** Algaltoxin-variabilitás vizsgálata egy eutróf vízterben.
Hidrol. Közlöny. 94 (5-6), 104-106, 2014. ISSN: 0018-1323.

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

2. **Ujvárosi, A. Z.,** Herczog, K., Riba, M., Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G., Žegura, B.: The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line.
Chemosphere. 240, 1-11, 2020. ISSN: 0045-6535.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124880>
IF: 5.108 (2018)
3. **Ujvárosi, A. Z.,** Riba, M., Garda, T., Gyémánt, G., Vereb, G., Mikóné Hamvas, M., Vasas, G., Máthé, C.: Attack of *Microcystis aeruginosa* bloom on a *Ceratophyllum submersum* field: Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure.
Sci. Total Environ. 662, 735-745, 2019. ISSN: 0048-9697.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.226>
IF: 5.589 (2018)

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (2)

4. **Ujvárosi, A. Z.:** Hazai eutróf vízter mikroscisztin termelésének és akkumulációjának vizsgálata.
In: XIV. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia : Pécs, 2014. április 23-25. : konferencia-kötet : program és előadás-összefoglalók. Szerk.: Kovács Mónika, Schmidt Petra, Publikon ; Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Földrajzi Intézet, Pécs, 2014. ISBN: 9786155457098
5. **Ujvárosi, A. Z.,** Vasas, G.: Algaltoxin-variabilitás vizsgálata egy eutróf vízterben.
In: Akvatikus és teresztris kutatások kapcsolata : Hidrobiológus Napok programfüzete. Szerk.: Bíró Péter, Reskóné Nagy Mária, Kiss Keve Tihamér, Magyar Hidrológiai Társaság Limnológiai Szakosztálya ; Tihany : MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet ; Veszprém : Veszprémi Területi Bizottsága, Budapest, 48, 2013.





További közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

6. Riba, M., Borsodi, A., **Ujvárosi, A. Z.**, Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata.

Hidrol. Közlöny. 96, 79-82, 2017. ISSN: 0018-1323.

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

7. Riba, M., Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vítál, Z., Borsodi, A., Krett, G., Borics, G., **Ujvárosi, A. Z.**, Vasas, G.: Microcystis Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp.

Toxins. 11 (5), 1-27, 2019. EISSN: 2072-6651.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11050288>

IF: 3.895 (2018)

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (1)

8. Riba, M., Borsodi, A., **Ujvárosi, A. Z.**, Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata.

In: Genetikai és molekuláris biológiai kutatások jelentősége a hidrobiológiában : LVII.

Hidrobiológus Napok : Tihany, 2015. október 7-9. Szerk.: Tóth Viktor, MTA ÓK Balatoni Limnológiai Intézet, Tihany, 40-41, 2015.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,592

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,697

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.10.10.



**SHORT THESIS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY (PHD)**

**Investigation of the toxicity of
Microcystis species under field and
laboratory conditions**

by Andrea Zsuzsanna Ujvárosi

Supervisor: Prof. Dr. Gábor Vasas



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and
Environmental Sciences

DEBRECEN, 2020

Introduction

The occurrence of cyanobacterial water blooms in fresh waters has been raised in the past few decades due to eutrophication. Toxic cyanobacterial blooms (cyanoHABs) are commonly formed by *Microcystis* in freshwater ecosystems. They produce a wide range of bioactive secondary metabolites from which the most ubiquitously present group is the microcystins (MC). Another group, the microginins (MG) is also present in co-occurrence with microcystins (MCs) and it is generally believed that toxicity of MGs is much lower than that of MCs (Janssen, 2019).

MCs are cyclic heptapeptides containing Adda (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) moiety. MCs are known to inhibit protein phosphatase 1 and 2A. They induce the formation of intracellular reactive oxygen species (ROS) which can lead to lipid, protein and DNA peroxidations (Pham and Utsumi, 2018; Štern et al., 2019). MCs are persistent metabolites in fresh waters. They are present through the food chain, however at higher trophic levels (e.g. molluscs, bivalves, fish, birds) they have been shown to be harmful as well. Bioaccumulation of MCs in phytoplankton, zooplankton as well as in plant and animal tissues was observed (Pham and Utsumi, 2018).

Microginins (MGs) are linear peptides consisting of a decanoic acid derivate, 3-amino-2-hydroxy-decanoic acid (Ahda) and three to five additional amino acids at the C-terminal end (Ishida et al., 1998), though variants with three or four amino acids were also reported (Sano and Kaya, 1997; Stewart et al., 2018). The production of

MGs has been observed worldwide from isolated strains; however, their environmental concentrations in eutrophic lakes up to 2.21 $\mu\text{g L}^{-1}$ were reported in one study only (Beversdorf et al., 2017). The data on toxic activity of microginins are scarce. To the best of our knowledge, there are only three studies addressing acute toxicity of microginins on animal model organisms (Bober and Bialczyk, 2017; Lenz et al., 2019; Fernandes et al., 2019). MGs are zinc metalloprotease inhibitors and were reported to inhibit angiotensin-converting enzyme (ACE), aminopeptidase M (APM) and leucin aminopeptidase (LAP) (Ishida et al., 2000; Sano et al., 2005; Lodin-Friedman and Carmeli, 2018).

The present work includes two sections studying two oligopeptide groups produced by *Microcystis sp.* The first is studying the toxicity of MCs under field conditions and the second is studying *in vitro* the adverse effects of the MGs at molecular and cellular level as well as in the vascular plant.

Aims of the study

1. Our purpose was to observe the water bloom events during 3 years while we aimed to identify the bloom-forming and MC producer species, as well as to study the dynamics of toxin production and variability of toxins under field conditions.
2. We aimed to determine the extracellular and intracellular MC content in the eutrophic Lake Bárdos, and to evaluate the toxicity of the phytoplankton samples in *in vitro* plant test.

3. Study the MC bioaccumulation potential of the aquatic macrophyte *Ceratophyllum submersum* affected by water blooms in the real environment.
4. Our goal was to describe the oligopeptide patterns of laboratory cultured *Microcystis* isolates and to purify the compounds with column chromatography-mass spectrometry methods.
5. We aimed to study the influence of the cyanobacterial extracts containing MGs in *in vitro* plant system, in comparison with an extract of a well-characterized MC producer strain.
6. We aimed to determine the *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of the cyanobacterial extracts of *Microcystis* isolated strains as well as pure microginin congeners in the experimental model with human hepatocellular carcinoma cell line HepG2.

Materials and methods

All samples were collected from the Hungarian Lake Bárdos from cyanoHAB site and a distant, control site between 2011 and 2013. *Ceratophyllum submersum* samples were collected in 2012. Morphological characteristics of cyanobacterial species were identified and classified according to Komárek and Anagnostidis (1998).

Microcystis sp. B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 strains were isolated and further cultured in nitrate-containing Allen medium (26±1°C, continuous illumination (100 lu m⁻² s⁻¹), bubbling with sterile air

containing 5% CO₂) (Allen, 1968). Subsequently, cells were harvested and lyophilized.

The lyophilized phytoplankton (cyanobacterial) samples from the water blooms of Lake Bárdos were extracted using deionized ultrapure water. The lyophilized water samples from the HAB and control sites were dissolved in deionized ultrapure water. *Ceratophyllum* plant samples were extracted using 99.8% methanol, the extracts were concentrated in a rotary evaporator and were dissolved in deionized ultrapure water for ELISA and Blue-green *Sinapis* (BGST) tests.

Lyophilized cyanobacterial cells from B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 strains were extracted using 99.8% methanol, evaporated and dissolved in 50% ethanol for analytical measurements and toxicity bioassays. Samples were dissolved in sterile ultrapure water for BGST tests.

For the purification of MCs and MGs, lyophilized cyanobacterial cells were extracted using 99.8% methanol according to Vasas et al. (2006) with minor modifications. The MC containing sample was loaded onto a DEAE-cellulose (DEAE-52) column. For the purification of MGs from B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 isolates, we used DEAE-cellulose, Toyopearl HW-40 cartridges (Vasas et al., 2002, 2013) and C18 flash and C18 HPLC columns according to Bober et al. (2011) with minor modifications.

The identification of MC congeners was performed with MALDI-TOF mass spectrometer as described previously (Vasas és mtsai., 2013). The peak fractions collected in each chromatography step as well as cyanobacterial extract composition were analysed with a liquid chromatography-electrospray ionization-mass

spectrometry (LC-ESI-MS/MS) method according to Riba et al. (2019).

Quantitative measurement of total microcystin content in water bloom (intracellular MC), water (extracellular MC) as well as *Ceratophyllum submersum* plant samples was carried out by ELISA kit (Enzo Life Sciences; ALX-850-319-KI01) according to the manufacturer's instructions.

DNA extraction was carried out using phenol-chloroform method, while the *Microcystis* and *Planktothrix* specific *mcy* gene clusters were analysed using PCR and agarose gel electrophoresis (Farkas et al., 2014).

The Blue Green Sinapis Test (BGST, *Sinapis alba* var. budakalászi sárga) (Kós et al., 1995; Vasas et al., 2002) was performed with minor modifications to measure the inhibition of plant growth caused by cyanobacterial extracts from phytoplankton samples of Lake Bárdos as well as B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 strains.

HepG2 cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in Williams' medium E supplemented with 15% foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 100 U mL⁻¹ penicillin/streptomycin. As positive controls in genotoxicity assays, BaP (benzo[a]pyrene) and etoposide were used as well-established pro-carcinogen and DNA synthesis inhibitor, respectively. In addition, microcystin-LR (MC-LR) and cylindrospermopsin (CYN) were included as cyanotoxin controls.

The cytotoxicity of cyanobacterial B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 extracts and purified compounds was determined after 24 and 72 h exposure by MTT assay according to Mosmann (1983) with minor modifications

(Žegura et al., 2008). The viability of treated cells was determined by comparison with vehicle control (medium containing 0.1% ethanol).

The induction of DNA breaks by the cyanobacterial extracts and MGs was determined after 4 and 24 h exposure with the alkaline comet assay described by Singh et al. (1988) with minor modifications (Žegura et al., 2004).

The induction of DNA double-strand breaks by the cyanobacterial extracts and MGs was determined after 24 and 72 h exposure with the γ H2AX assay on flow-cytometer using anti-H2AX pS139-FITC antibody (Hercog et al., 2019).

The influence of cyanobacterial extracts and MGs after 24 h exposure on genomic instability of HepG2 cells was evaluated with the CBMN assay (Fenech, 2000) with minor modifications. HepG2 cells in the assay were processed as described by Štraser et al. (2011).

Results

I. Field study – Lake Bárdos

During the water bloom events of 2011 and 2013, the dominant bloom-forming species was *Planktothrix agardhii*. However, we observed difference with the massive presence of *Microcystis sp.* in August 2012.

All of the *Microcystis* specific MC biosynthesis genes (*mcyA-E, G*) were detected in the samples collected at 3 Aug 2011, 22 Aug 2012 and 28 Aug 2013. However, from *Planktothrix* specific MC biosynthesis genes all

samples were only *mcyT+*. The results showed the presence of *mcy+/mcy-* *Microcystis* genotype populations during each year, and that the *mcy+* genotype was spread during 2012.

Four different variants of microcystins were detected in the purified cyanobacterial sample in 2012: MC-LR, MCYR, [Dha7] MC-RR and MC-LY, which are commonly present in fresh water cyanobacterial blooms.

In August 2012, microcystins were not detected in the water samples of the control area, while from the area of the water bloom (HAB site) their concentration was $7.31 \pm 0.17 \mu\text{g L}^{-1}$. The cyanobacterial extract from August 2012 contained $4.959 \mu\text{g mg dw}^{-1}$ microcystins, and from August 2013 contained $0.449 \mu\text{g mg dw}^{-1}$ MC. On other sampling dates microcystins content were not detected.

Bioaccumulation of the extracellular MC in the water body was measured in *Ceratophyllum submersum* plant tissues. In 2012, samples of *C. submersum* macrophyte were collected from a distant control site and from the blooming (HAB) site. Concentration of microcystins in plant sample from the area of the water bloom was $1.01 \pm 0.21 \mu\text{g g dw}^{-1}$, while from the control area it was $0.05 \pm 0.03 \mu\text{g g dw}^{-1}$. Further, the effect of the cyanobacterial phytoplankton samples on plant growth was studied *in vitro* with the BGST test. Cyanobacterial extracts from August 2012 and August 2013 significantly inhibited the growth at 3.2 and 6.4 mg mL⁻¹ concentrations, respectively. The sample from August 2012 resulted to be more toxic, where the IC₅₀ was calculated as 2.145 mg mL⁻¹. The growth of seedlings treated with the phytoplankton extract from August 2013 was less inhibited, which resulted a 5.678 mg mL⁻¹ of IC₅₀. While

the extracts from the other sampling dates did not inhibit the seedling growth.

II. study – *In vitro* study of oligopeptides

Two *Microcystis* isolates (B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 strains) were used in this study. These strains produced various microginin (MG) congeners. The peak areas of the detected MG congeners within their cyanobacterial extracts were calculated as percentages of the detected compounds. LC-ESI-MS/MS analysis of the cyanobacterial extracts showed that the *Microcystis sp.* B-14-01 strain produced MG 565 (8.98%; Ahda-Thr-Pro-Tyr), MG FR3 (21.08%; Ahda-Thr-Pro-Tyr-Tyr), cyanostatin B (51.51%; Ahda-Tyr-MeIle-Pro-Tyr), MG GH787 (17.35%; ClAhda-Tyr-MeIle-Pro-Tyr) congeners, and a MG-like metabolite, MGL 402 (1.02%; Ahda-Thr-Pro), which we described here for the first time. The extract of the cyanobacterial strain F-14/9-S12-4-A-01 contained a set of identical congeners, namely cyanostatin B (68.11%), MG GH787 (29.32%) és MG FR3 (2.57%). Therefore, the purification of MGs was performed only with minor modifications from the two extracts, and 17.51 mg of total MG was yielded from 70 g lyophilized cells.

The effect of B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 cyanobacterial extracts containing MGs on plant growth was studied with the BGST test. As a positive control we applied the MC producer, BGSD 243 strain originated from the culture collection of Department of Botany, University of Debrecen (Vasas et al., 2006). The cyanobacterial extracts with MGs significantly reduced

the growth at $\geq 3.2 \text{ mg mL}^{-1}$. Both of the cyanobacterial extracts containing MGs showed lower activity on growth inhibition compared to BGSD 234 extract ($\text{IC}_{50} 0.076 \text{ mg mL}^{-1}$). On the other hand, the IC_{50} of the F-14/9-S12-4-A-01 extract was 3 times lower ($\text{IC}_{50} 5.5 \text{ mg mL}^{-1}$) than that of B-14-01 extract ($\text{IC}_{50} 16.217 \text{ mg mL}^{-1}$). We also observed that both extracts at $0.8\text{-}1.6 \text{ mg mL}^{-1}$ concentration range stimulated the seedling growth. This is the first report of cyanobacterial extracts containing MGs inhibiting plant seedling growth.

The viability and proliferation of HepG2 cells were determined after 24 and 72 h exposure, respectively. The B-14-01 cyanobacterial extract significantly reduced the cell viability by approximately 14% and 33% at 6.25 and $10 \text{ }\mu\text{g}$ dry weight of cyanobacterial extract mL^{-1} , respectively, ($\text{IC}_{50} 214.8 \pm 1.19 \text{ }\mu\text{g dry weight mL}^{-1}$). The F-14/9-S12-4-A-01 cyanobacterial extract was more cytotoxic after 24 h exposure ($\text{IC}_{50} 58 \pm 2.07 \text{ }\mu\text{g dw mL}^{-1}$), reducing the viability of HepG2 cells by approximately 30% at $6.25 \text{ }\mu\text{g dw mL}^{-1}$. Pure microginins did not affect cell viability at tested concentrations compared to vehicle control. After 72 h exposure the B-14-01 cyanobacterial extract concentration dependently reduced cell proliferation ($\text{IC}_{50} 211.5 \pm 1.05 \text{ }\mu\text{g dry weight mL}^{-1}$). However, F-14/9-S12-4-A-01 extract showed lower cytotoxic effect ($\text{IC}_{50} 279.08 \pm 3.92 \text{ }\mu\text{g dw mL}^{-1}$). The most potent MG congener was MGL 402 with approximately 22 and 42% decrease of cell viability at 50 and $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. MG FR3 showed lower cytotoxic activity with approximate reduction for 23 and 20% at 50 and $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. MG GH787 and cyanostatin B showed similar cytotoxic activity with

significant decrease of cell viability at $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ for approximately 25%; however, at the highest tested concentration ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) these two congeners showed lower activity (32% and 30%, respectively) compared to MGL 402. The congeners MG 565+cyanostatin B significantly, by approximately 32% reduced the cell viability only at $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration, however, at higher concentrations no significant effect was observed compared to control. For MC-LR ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) and CYN ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) after 24 h exposure, no significant effect on cell viability was observed. After 72 h, CYN decreased cell proliferation for approximately 55% compared to control, while MC-LR had no significant effect.

The cyanobacterial extracts induced concentration and time dependent increase of DNA damage after 4 and 24 h of exposure. The extract B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 increased DNA damage statistically significantly at concentrations $\geq 0.01 \mu\text{g dw mL}^{-1}$ and $\geq 0.1 \mu\text{g dw mL}^{-1}$, respectively at both exposure times. Cyanostatin B, MG 565+cyanostatin B, MG GH787 and MG FR3 induced statistically significant increase of DNA strand breaks after 4 h exposure at concentrations $\geq 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, while MGL 402 increased DNA damage at concentrations $\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$. After 24 h, MGL 402 was the most potent variant inducing DNA damage at concentrations $\geq 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cyanostatin B and MG GH787 significantly increased DNA damage at concentrations $\geq 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. MG FR3 was the least potent variant inducing only slight though statistically significant increase of DNA damage at $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ compared to control. MG 565+cyanostatin B increased DNA damage at $\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ after 24 h exposure which showed less genotoxic potential as it was

observed for cyanostatin B alone. CYN ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) increased DNA damage statistically significantly at both exposure times.

After 24 and 72 h exposure to cyanobacterial extracts B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 ($1 \mu\text{g dw mL}^{-1}$) and MGs ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) the induction of DSBs was analysed by flow cytometry. None of the studied MGs statistically significantly increased the formation of γH2AX foci.

The influence of cyanobacterial extracts B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01 ($1 \mu\text{g dw mL}^{-1}$) and MGL 402, MG FR3, cyanostatin B, MG 565+cyanostatin B, MG GH787 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) on genomic instability of HepG2 cells after 24 h of exposure was evaluated with the CBMN assay. B-14-01 extract did not affect the frequencies of MNed cells, MNi and NBUDs, while the number of NPBs was increased for more than 2-fold compared to control group. F-14/9-S12-4-A-01 extract increased the frequencies of MNed cells and MNi which was less than 2-fold compared to control. Only MG GH787 statistically significantly increased the frequencies of the MNed cells, MNi and NPBs that were more than 2-fold higher compared to control group. Cyanostatin B, MGL 402, MG FR3 statistically significantly increased the frequencies of MNed cells and MNi; however, the increase was less than 2-fold compared to control. Nevertheless, we can notice that cyanostatin B, the structurally formula of which is very similar to the one of MG GH787 (chlorinated cyanostatin B), significantly increased the frequency of MNi for 1.7-fold compared to control indicating some influence on genomic instability of HepG2 cells. MG 565+cyanostatin B increased the frequency of NPBs only which was different from the

effects of cyanostatin B congener alone. This observation resembles the effects observed in comet assay, where the MG 565+cyanostatin B induced less DNA damage as cyanostatin B alone. The NDI (nuclear division index) was not reduced by the cyanobacterial extracts and MGs compared to control group. CYN significantly increased the frequencies of the MNed cells, MNi and NBUDS for 2-fold compared to control and statistically significantly reduced the NDI.

Summary

The first part, a field study, was based on the observations of a toxic, MC producing *Microcystis aeruginosa* waterbloom event detected in the early 2000s. In our work, we studied the toxicity of MCs under field conditions during 3 years (2011-2013) in Lake Bárdos (Gyula, Hungary). During the waterbloom of August 2012 *Microcystis sp.* was the dominant species in Lake Bárdos, while in 2011 and 2013 *Planktothrix agardhii* was the main bloom-forming species. The analyses of the biosynthesis genes proved *mcy+* population overgrowth in the phytoplankton sample of August 2012 which corroborated that *Microcystis sp.* was responsible for producing MCs. Oligopeptide pattern analyses showed that the phytoplankton sample from August 2012 contained fairly common MC congeners.

The waterbloom of August 2012 contained higher concentrations of MC. There was a strong correlation between these results and the toxicity observed from mustard seedling growth test, as the sample from August 2012 exerted the highest activity on growth inhibition.

We demonstrated that *Ceratophyllum submersum*, a submerged aquatic macrophyte, is capable of accumulating MC in their tissues in higher concentrations in the toxic aquatic environment. In view of the accumulation potential of MCs in vascular plants in relation to the toxin concentrations detected in their natural aquatic environments, we can understand better the MC bioaccumulation processes. This is relevant, as most of the studies focusing on the bioaccumulation of MC are under laboratory conditions where the plants are rarely or not at all influenced by the external environmental factors.

The second part of our work was focusing on microginin (MG) producer *Microcystis* isolated laboratory strains. This work investigates the toxicity of MGs and cyanobacterial extracts in human cellular and plant test systems.

We demonstrated that the oligopeptide patterns of two *Microcystis* isolates showed similarity and MGL 402, MG 565, MG FR3, cyanostatin B and MG GH787 microginins were identified and purified. Here, we reported the congener MGL 402 for the first time.

Our work is the first to describe the effects of MG containing cyanobacterial extracts on plants. We used the well established MC-sensitive *Sinapis alba* seedling growth test. Both of the cyanobacterial extracts containing MGs showed lower activity on growth inhibition compared to the cyanobacterial extract containing MC.

Cyanobacterial extracts and pure MGs showed relatively low cytotoxicity on HepG2 cells. Here, we provided evidence for the first time that MGs exert

genotoxic activity in HepG2 cells. The cyanobacterial extracts and pure MGs induced DNA strand breaks after 4 and 24 h exposure in the comet assay. However, cyanobacterial extracts and MGs after 24 and 72 h exposure did not induce the formation of DNA double-strand breaks.

Our observations suggest that MGs are capable of inducing genomic alterations, and the cyanobacterial extracts showed similar activity as it was observed for the dominant congeners in the extracts. Our results indicate that MGs may represent hazards for aquatic environments and humans, however further studies are required for the assessment of the potential risk.

Novel scientific results

- In a comprehensive environmental study we demonstrated the presence of *Microcystis*-related *mcy+* genotypes in environmental samples from an eutrophic lake (Lake Bárdos), and proved that *Microcystis sp.* was responsible for the MC toxin production in the water bloom event.
- High concentrations of MC were detected in the water and phytoplankton at HAB site. The MC containing water body affected *Ceratophyllum submersum* plants living at this site. We demonstrated the MC bioaccumulation processes in the real environment, in which high level of MC content was observed in *Ceratophyllum submersum* submerged macrophyte.
- Here we described MGL 402 for the first time.
- We demonstrated that the cyanobacterial extracts containing MGs and pure MGs affect the viability and proliferation of HepG2 cells.
- We reported for the first time the genotoxic activity of the cyanobacterial extracts B-14-01 and F-14/9-S12-4-A-01, and MGL 402, MG FR3, cyanostatin B, MG GH787, MG 565+cyanostatin B congeners. We demonstrated that they induce the formation of DNA strand breaks, but not the formation of DNA double-strand breaks.

- MG GH787 and cyanostatin B congeners, and the cyanobacterial extract B-14-01 influenced the genomic instability of HepG2 cells.
- Cyanobacterial extracts containing MGs showed growth inhibitory activity on *Sinapis alba* seedlings.

Irodalomjegyzék/ References

1. Allen, M.M., 1968. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4, 1–4.
2. Beversdorf, L.J., Weirich, C.A., Bartlett, S.L., Miller, T.R., 2017. Variable cyanobacterial toxin and metabolite profiles across six eutrophic lakes of differing physiochemical characteristics. *Toxins (Basel)*. 9, 62.
3. Bober, B., Bialczyk, J., 2017. Determination of the toxicity of the freshwater cyanobacterium *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin. *J. Appl. Phycol.* 29, 1355–1362.
4. Bober, B., Lechowski, Z., Bialczyk, J., 2011. Determination of some cyanopeptides synthesized by *Woronichinia naegeliana* (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycol. Res.* 59, 286–294.
5. Farkas, O., Gyémant, G., Hajdú, G., Gonda, S., Parizsa, P., Horgos, T., Mosolygó, Á., Vasas, G., 2014. Variability of microcystins and its synthetase gene cluster in *Microcystis* and *Planktothrix* waterblooms in shallow lakes of Hungary. *Acta Biol. Hung.* 65, 227–239.
6. Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 81–95.
7. Fernandes, K., Gomes, A., Calado, L., Yasui, G., Assis, D., Henry, T., Fonseca, A., Pinto, E., 2019. Toxicity of cyanopeptides from two *Microcystis* strains on larval development of *Astyanax altiparanae*. *Toxins (Basel)*. 11, 220.

8. Hercog, K., Maisanaba, S., Filipič, M., Sollner-Dolenc, M., Kač, L., Žegura, B., 2019. Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Sci. Total Environ.* 687, 267–276.
9. Ishida, K., Kato, T., Murakami, M., Watanabe, M., Watanabe, M.F., 2000. Microginins, zinc metalloproteases inhibitors cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron.* 56, 8643–8656.
10. Ishida, K., Matsuda, H., Murakami, M., 1998. Four new microginins, linear peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron.* 54, 13475–13484.
11. Janssen, E.M.L., 2019. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Res.* 151, 488–499.
12. Komárek, J., Anagnostidis, K., 1998. Cyanoprokaryota 1. Chroococcales, Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
13. Kós, P., Gorzó, G., Surányi, G., Borbély, G., 1995. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Anal. Biochem.* 225, 49–53.
14. Lenz, K.A., Miller, T.R., Ma, H., 2019. Anabaenopeptins and cyanopeptolins induce systemic toxicity effects in a model organism the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere.* 214, 60–69.
15. Lodin-Friedman, A., Carmeli, S., 2018. Microginins from a *Microcystis sp.* bloom material collected from the Kishon reservoir, Israel. *Mar. Drugs.* 16, 78.
16. Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55–63.
17. Pham, T.L., Utsumi, M., 2018. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *J. Environ. Manage.* 213, 520–529.

18. Riba, M., Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vitál, Z., Borsodi, A.K., Krett, G., Borics, G., Ujvárosi, A.Z., Vasas, G., 2019. *Microcystis* chemotype diversity in the alimentary tract of bigheaded carp. *Toxins (Basel)*. 11, 288.
19. Sano, T., Kaya, K., 1997. A 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid-containing tetrapeptide from *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry*. 44, 1503–1505.
20. Sano, T., Takagi, H., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Kaya, K., 2005. Leucine aminopeptidase M inhibitors, cyanostatin A and B, isolated from cyanobacterial water blooms in Scotland. *Phytochemistry*. 66, 543–548.
21. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
22. Štern, A., Rotter, A., Novak, M., Filipič, M., Žegura, B., 2019. Genotoxic effects of the cyanobacterial pentapeptide nodularin in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 124, 349–358.
23. Stewart, A.K., Ravindra, R., Van Wagoner, R.M., Wright, J.L.C., 2018. Metabolomics-guided discovery of microginin peptides from cultures of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Nat. Prod.* 81, 349–355.
24. Štraser, A., Filipič, M., Žegura, B., 2011. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch. Toxicol.* 85, 1617–1626.
25. Vasas, G., Farkas, O., Borics, G., Felföldi, T., Sramkó, G., Batta, G., Bácsi, I., Gonda, S., 2013. Appearance of *Planktothrix rubescens* bloom with [D-Asp³, Mdha⁷]MC-RR in gravel pit pond of a shallow lake-dominated area. *Toxins (Basel)*. 5, 2434–2455.
26. Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, G., Batta, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., Máthé, C., Grigorszky, I., Molnár, E., Borbély, G., 2002. Capillary electrophoretic assay and

- purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (Blue-Green Sinapis Test). *Anal. Biochem.* 302, 95–103.
27. Vasas, G., Szydłowska, D., Gáspár, A., Welker, M., Trojanowicz, M., Borbély, G., 2006. Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 66, 87–97.
28. Žegura, B., Lah, T.T., Filipič, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology.* 200, 59–68.
29. Žegura, B., Zajc, I., Lah, T.T., Filipič, M., 2008. Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicol.* 51, 615–623.



Candidate: Andrea Zsuzsanna Ujvárosi

Neptun ID: H6TCFM

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10045481

List of publications related to the dissertation

Hungarian scientific articles in Hungarian journals (1)

1. **Ujvárosi, A. Z.**: Algatoxin-variabilitás vizsgálata egy eutróf vízterében.
Hidrol. Közöny. 94 (5-6), 104-106, 2014. ISSN: 0018-1323.

Foreign language scientific articles in international journals (2)

2. **Ujvárosi, A. Z.**, Herczeg, K., Riba, M., Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G., Žegura, B.: The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line.
Chemosphere. 240, 1-11, 2020. ISSN: 0045-6535.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124880>
IF: 5.108 (2018)
3. **Ujvárosi, A. Z.**, Riba, M., Garda, T., Gyémánt, G., Vereb, G., Mikóné Hamvas, M., Vasas, G., Máthé, C.: Attack of *Microcystis aeruginosa* bloom on a *Ceratophyllum submersum* field: Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure.
Sci. Total Environ. 662, 735-745, 2019. ISSN: 0048-9697.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.226>
IF: 5.589 (2018)

Hungarian abstracts (2)

4. **Ujvárosi, A. Z.**: Hazai eutróf vízter mikrocsiztin termelésének és akkumulációjának vizsgálata.
In: XIV. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia : Pécs, 2014. április 23-25. : konferencia-kötet : program és előadás-összefoglalók. Szerk.: Kovács Mónika, Schmidt Petra, Publikon ; Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Földrajzi Intézet, Pécs, 189, 2014. ISBN: 9786155457098
5. **Ujvárosi, A. Z.**, Vasas, G.: Algatoxin-variabilitás vizsgálata egy eutróf vízterben.
In: Akvatikus és teresztrisz kutatások kapcsolata : Hidrobiológus Napok programfüzete. Szerk.: Biró Péter, Reskóné Nagy Mária, Kiss Keve Tihamér, Magyar Hidrológiai Társaság Limnológiai Szakosztálya ; Tihany : MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet ; Veszprém : Veszprémi Területi Bizottsága, Budapest, 48, 2013.





List of other publications

Hungarian scientific articles in Hungarian journals (1)

6. Riba, M., Borsodi, A., **Ujvárosi, A. Z.**, Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata.
Hidrol. Közlöny. 96, 79-82, 2017. ISSN: 0018-1323.

Foreign language scientific articles in international journals (1)

7. Riba, M., Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vítál, Z., Borsodi, A., Krett, G., Borics, G., **Ujvárosi, A. Z.**, Vasas, G.: Microcystis Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp.
Toxins. 11 (5), 1-27, 2019. EISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11050288>
IF: 3.895 (2018)

Hungarian abstracts (1)

8. Riba, M., Borsodi, A., **Ujvárosi, A. Z.**, Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata.
In: Genetikai és molekuláris biológiai kutatások jelentősége a hidrobiológiában : LVII. Hidrobiológus Napok : Tihany, 2015. október 7-9. Szerk.: Tóth Viktor, MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézet, Tihany, 40-41, 2015.

Total IF of journals (all publications): 14,592

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 10,697

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

10 October, 2019

