

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in  
fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science

**FUNCTIONALITY OF XVE-INDUCIBLE SYSTEM AND  
TRANSCRIPTOMIC PROFILING OF *MESSASTRUM GRACILE* SE-MC4  
EXPOSED TO 17-B-ESTRADIOL**

**GAN SIK ZE**

**2023**

**Main supervisor : Associate Professor Cha Thye San, Ph.D.**

**Co-Supervisor : Professor Yeo Chiew Chieng, Ph.D.**

**School/Institute : Institute of Marine Biotechnology**

PezT is a toxin originated from the bacterial pathogen *Streptococcus pneumoniae* which inhibits the bacterial cell wall synthesis. The functionality of toxin PezT has been studied in various eukaryotic organism such as *Arabidopsis thaliana*, zebrafish, and yeast and even in human cell line. However, there is little research regarding the functionality of toxin PezT in microalgae which currently is limited only in *Chlorella vulgaris*. This current research demonstrated the effect of toxin PezT in another green microalga, *Messastrum gracile* SE-MC4. The pMDC150\_35S activator vector (harbouring the XVE expression cassette) and pMDC221\_pezTGFP responder vector (harbouring *pezT-GFP* fusion genes) were co-transformed into *M. gracile* SE-MC4 through *Agrobacterium*-mediated transformation. Antibiotic selection followed by PCR validation confirmed the stable transgenic lines which was designated *M. gracile* SE-MC4 (*pezT-GFP*) for further experiments. Upon the induction of 17- $\beta$ -estradiol,

GFP signal was detected in transgenic *M. gracile* SE-MC4 (pezT-GFP) cells which showed the success of transformation. The functionality and action of the PezT toxin was further demonstrated with a significant reduction in cell viability of transgenic cells by more than 51% compared to wild-type cells. This indicated the possible use of the bacterial PezT toxin to develop novel means of harvesting the cellular content of microalgae through lysis of transgenic microalgae cells by initiate the expression of toxin with appropriate inducer. To investigate the possible mechanisms of PezT toxicity in *M. gracile* SE-MC4, transcriptomic profiling was performed in SE-MC4 (pezT-GFP) cells induced with 17- $\beta$ -estradiol. However, the lethality of PezT precluded the extraction of sufficient total RNA from induced cells for transcriptome profiling. Nevertheless, investigations into 17- $\beta$ -estradiol induction in wild-type *M. gracile* SE-MC4 led to interesting findings that more than 30% of endocytosis-related genes were upregulated at 6 h of treatment. As 17- $\beta$ -estradiol is considered an environmental estrogen pollutant, the possible enhancement of the formation of clathrin-coated endocytic vesicles in *M. gracile* SE-MC4 in response to 17- $\beta$ -estradiol could potentially lead to its utility as a bioremediation strain.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu  
sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Sarjana Sains

**KEFUNGSIAN SISTEM INDUKSI-XVE DAN PEMPROFILAN  
TRANSKRIPTOMIK *M. GRACILE* SE-MC4 TERDEDAH KEPADA  
17- $\beta$ -ESTRADIOL**

**GAN SIK ZE**

**2023**

**Penyelia utama : Profesor Madya Cha Thye San, Ph.D.**  
**Penyelia bersama : Profesor Yeo Chiew Chieng, Ph.D.**  
**Pusat Pengajian/Institut : Institut Bioteknologi Marin**

PezT adalah toksin berasal dari *Streptococcus pneumoniae* yang menghalang sintesis dinding sel bakteria. Kefungsian toksin pezT telah dikaji dalam pelbagai organisma eukaryotik seperti *Arabidopsis thaliana*, ikan zebra, yis dan juga turus sel manusia. Walau bagaimanapun, kajian kefungsian toxin pezT terhadap mikroalga amat kurang yang hanya terhad kepada *Chlorella vulgaris* sahaja. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk menunjukkan kesan toksin pezT terhadap species mikroalga lain, iaitu *Mesastrum gracile* SE-MC4. Vektor pengaktif (mengandungi kaset ungkapan XVE) dan vektor pembalas (mengandungi kaset gen gabungan *pezT-GFP*) telah ditransformasi bersama-sama ke dalam *M. gracile* SE-MC4 melalui transformasi pengantaraan *Agrobacterium*. Pengesaaan PCR selepas pemilihan antibiotik telah digunakan untuk mengesahkan turus transgenik stabil yang dinamakan sebagai *M. gracile* SE-MC4 (PezT-GFP) untuk eksperimen seterusnya. Semasa induksi 17- $\beta$ -

estradiol, isyarat GFP dapat dikesan dalam transgenik *M. gracile* SE-MC4 (pezT-GFP). Ini menunjukkan transformasi transgen pezT-GFP ke dalam transgenic *M. gracile* SE-MC4 adalah berjaya. Fungsi toksin pezT didemonstrasi selanjutnya dengan pengurangan daya hidup sel sebanyak 51 % berbanding dengan sel mikroalga jenis liar. Kajian ini menunjukkan potensi cara penuaian kandungan seluleryang cekap melalui lisis sel mikroalga transgenik yang dicetuskan melalui induksi dengan isyarat yang sesuai. Pemprofilan transkriptomik induksi 17- $\beta$ -estradiol dalam sel SE-MC4 (PezT-GFP) telah dilaksana untuk mengkaji mekanisma ketoksanan PezT terhadap *M. gracile* SE-MC4. Walau bagaimanapun, fungsi kemautan toksin PezT menghalang pemencilan RNA berkualiti yang mencukupi bagi pemprofilan transkriptomik. Namun begitu, dapatan hasil kajian menunjukkan induksi 17- $\beta$ -estradiol dalam *M. gracile* SE-MC4 strain liar menunjukkan lebih daripada 30 % gen berkaitan-endositosis dengan pengekspresannya ditingkatkan. Oleh kerana 17- $\beta$ -estradiol merupakan sejenis estrogen pencemar alam sekitar, penambahbaikan pembentukan vesikel endositotik bersalut chathrin dalam *M. gracile* SE-MC4 sebagai maklum balas terhadap induksi 17- $\beta$ -estradiol menjadikan species ini berpotensi diguna untuk bioremediasi.