

A krómvegyületek hatásmechanizmusának vizsgálata eukarióta élesztő sejteken

Ph.D. disszertáció

Gazdag Zoltán

Ph.D. program: Mikroorganizmusok életfolyamatainak molekuláris analízise

Program és témavezető: Dr. Pesti Miklós egyetemi tanár

Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék

PTE, TTK, BI

Pécs

2008

Tartalomjegyzék

<u>1. Bevezetés</u>	3
1.1. Rövidítések	5
<u>2. Irodalmi előzmények</u>	6
2.1. A <i>Candida albicans</i> modellszervezet	6
2.1.1. A <i>Candida albicans</i> jellemzése	6
2.1.2. A kísérletek során használt <i>C. albicans</i> vad <i>33erg⁺</i> és a szterin mutáns <i>erg-2</i> törzsek jellemzése	6
2.2. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i> modellszervezet	8
2.2.1. A <i>S. pombe</i> általános jellemzése	8
2.2.2. A <i>S. pombe</i> rendszertana	9
2.2.3 A <i>S. pombe</i> életciklusa	10
2.3. A króm vegyületek hatásmechanizmusa	11
2.4. Reaktív oxigén gyökök	18
2.4.1. A molekuláris oxigén	18
2.4.2. A ROS-ok eredete	20
2.4.3. A szuperoxid gyök	20
2.4.4. Hidrogén peroxid	21
2.4.5. Hidroxilgyök	22
2.4.6. A lipid-peroxidáció	23
2.4.7. A ROS-ok ellen védő enzimek	24
2.4.8. Antioxidáns molekulák	25
2.4.9. A glutation, mint fő antioxidáns az élő szervezetekben	27
2.5. Kutatási előzmények	29
<u>3. Célkitűzések</u>	31
<u>4. Anyagok és módszerek</u>	32
4.1. Mikroorganizmusok	32
4.2. Anyagok	32
4.3. Táptalajok	33
4.4. Oldatok	34
4.5. Módszerek	34
4.5.1. Mikroorganizmusok fenntartása	34
4.5.2. <i>S. pombe</i> törzsek közép logaritmikus fázisban lévő tenyészeinek előállítása	35
4.5.3. Sejtek gyűjtése, mosása	35
4.5.4. CrCl ₃ gátló hatásának vizsgálata	35
4.5.5. Minta preparálása EPR spinjelölő kísérlethez	35
4.5.6. A spin jelölt EPR mérés paraméterei	36
4.5.7. 260 nm-en abszorbeálódó anyagok mérése	36
4.5.8. Peroxid koncentráció mérése áramlási citométerrel	37

4.5.9. Peroxid koncentráció mérése Perkin-Elmer LS50B fluoriméterrel	37
4.5.10. Sejtpusztítási kísérletek	37
4.5.11. Adaptációs kísérletek	38
4.5.12. Minta előkészítése emzimaktivitás méréshez	38
4.5.13. Glutation-reduktáz mérése	39
4.5.14. Kataláz mérése	40
4.5.15. Glutation-S-transzferáz mérése	40
4.5.16. Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz mérése	41
4.5.17. Glutation peroxidáz mérése	41
4.5.18. Szuperoxid-dizmutáz mérése	42
4.5.19. Glutation koncentráció mérése	43
4.5.19.1. Oxidált glutation (GSSG) mérése	43
4.5.19.2. Kalibrálás	44
4.5.20. Fehérjetartalom mérése	45
4.5.21. Szuperoxid gyök koncentráció mérése	46
4.5.22.1. Hidroxil gyök koncentráció mérése tisztított <i>Saccharomyces cerevisiae</i> GR által	46
4.5.22.2. •OH mérése részlegesen tisztított <i>S. pombe</i> kromát szenzitív mutáns GR által	47
4.5.22.3.. •OH mérése feltárt mintákból	47
<u>5. Eredmények</u>	48
5.1. A Cr(III) hatása <i>C. albicans</i> élesztő sejtek plazmamembránjára.	48
5. 1. 1. A króm(III)-plazmamembrán kölcsönhatás vizsgálata.	49
5. 2. A Cr(VI) hatása a hasadó élesztőben.	56
5. 2. 1. A <i>chr-51S</i> Cr(VI) szenzitív mutáns jellemzése	56
5. 2. 2. A <i>chr1-66T</i> króm(VI) toleráns mutáns jellemzése.	67
6. Eredmények értékelése:	74
6. 1. A króm(III) hatása élesztő sejtek plazmamembránjára	74
6. 2. A Cr(VI) hatásmechanizmusának vizsgálata.	75
6. 2. 1. A Cr(VI) szenzitivitás molekuláris mechanizmusa.	75
6.2.1.1. A Cr(VI) nem enzimikus redukciója	76
6.2.1.2. Enzimek szerepe a Cr(VI) redukcióban	76
6.2.1.3. A szabad gyökök szerepe	78
6. 2. 2. A Cr(VI) tolerancia molekuláris mechanizmusa.	79
<u>7. Összefoglalás</u>	82
<u>8. Irodalomjegyzék</u>	85
<u>Angol nyelvű összefoglalás (Summary)</u>	92

1. Bevezetés

Az elmúlt száz évben az ipari termelés növekedésével arányosan, robbanásszerűen megnőtt a nehézfémek alkalmazása, kitermelése, és ezzel párhuzamosan –mivel a környezetvédelem eközben fáziskésésben van az ipari fejlődéssel- a környezetszennyezés. A FAO adatai alapján a következő nehézfémek (amelyek sűrűsége $5 \text{ g (cm}^3\text{)}^{-1}$ -rel azonos vagy nagyobb) közül a világtermelés a 2000-es évekre az alábbi mennyiségeket érte el: króm (11 millió tonna), kadmium (20 000 tonna), réz (13,5 millió tonna), nikkel (380 650 tonna). A nehézfémek egy része az életfolyamatok számára fontos, esszenciális (Cu, Ni, Zn, Co, Cr) míg más részüknek biológiailag előnyös hatását nem ismerjük (Cd, Pb, Ag, Hg), ugyanakkor jól ismert, hogy az esszenciális elemek a természetes környezetben előforduló koncentrációnál magasabb mennyisége az élő sejtek, szervezetek számára stresszhatást kiváltó hatással rendelkeznek, toxikusak. Különösen veszélyes a fejlődő és fejletlen országokban a szennyvíztisztítás hiányos volta, vagy teljes hiánya, amely miatt jelentős az ivóvízkészletek elszennyeződése. A fentiekben vázolt összetett ökológiai, társadalmi, közgazdasági problémák hatékony gazdaságos kezeléséhez elengedhetetlen az egyes nehézfémek élő sejtre, szervezetre gyakorolt hatásmechanizmusának pontos ismerete.

Ezért kísérleti programunk alapvető célja ezen környezetszennyező nehézfémek, kiemelten a krómvegyületek hatásmechanizmusának vizsgálata. A króm Cr(VI) és Cr(III) oxidációs állapot fordul elő vizes oldatokban, ezért figyelmünket e két oxidációs állapotban lévő króm vegyületeknek szenteljük. Alaputatási programunkhoz modellszervezetként a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztőt választottuk, mert ez az egysejtű eukarióta, haploid szervezet kiválóan alkalmas, mind a klasszikus genetikai, mind a molekuláris genetikai vizsgálatokra.

A kutatási programot megelőzően számos jelentős eredmény született ezen a területen a kísérleti mikrobiológiában, amely segítette a program végrehajtását. Ezek közül a legfontosabbak:

1. Nyilvánvalóvá vált, hogy a fémionok felvétele egy bioadszorpciós passzív és egy bioakkumulációs, a sejt által befolyásolt szakaszra bontható.
2. Bizonyították, hogy a citoplazmába került ionokat a sejtek érzékelik, egy jelátviteli rendszeren keresztül szabályozzák a sejt védekezési folyamatait, változást idézve elő az enzimek aktivitásában és a génexpresszióban.
3. Kidolgozásra kerültek azok az érzékeny metodikák, amelyek lehetővé tették a reaktív oxigén gyökök, valamint az antioxidáns molekulák és enzimek mérését.

Ezen alapvető ismeretek mellett hangsúlyoznom kell, hogy az élőlények sokfélesége, az eltérő nehézfémek ma még jelentős mértékben ismeretlen hatásmechanizmusa arra készítetett bennünket, hogy ne általában, hanem konkrétan egy vegyületcsoport, a krómvegyületek hatásmechanizmusát vizsgáljuk egy adott élőlénycsoporton, az élesztőkön belül.

1.1. Rövidítések

5-SASL — 5-(4',4-dimetiloxazolidin-N-oxil)

6chr⁺ — *S. pombe* szülői törzs

C. albicans — *Candida albicans*

chr-51S — *S. pombe* kromát szenzitív mutáns

chr1-66T — *S. pombe* kromát toleráns mutáns

Cu/ZnSOD — réz/cink szuperoxid dizmutáz

DHR 123 — dihidrorodamin 123

d.v. — desztillált víz

EPR — elektron spin paramágneses rezonancia spektroszkópia

erg⁺ — ergoszterin termelő *C. albicans*

erg-2 — *C. albicans* szterin mutáns

ET — etidium-bromid

G6PD — glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

GPx — glutation peroxidáz

GR — glutation reduktáz

GSH — redukált glutation

GSSG — oxidált glutation

GST — glutation S-transzferáz

MD — menadion

MIC (MGK) — minimális gátló koncentráció

MnSOD — mangán szuperoxid dizmutáz

NADPH — nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

O₂^{•-} — szuperoxid gyök

•OH — hidroxil gyök

ROS — reaktív oxigén fajták (gyökök)

PBN — N-*tert*-butil- α -phenil nitron (elektronfogó spin jelölő)

S. cerevisiae — *Saccharomyces cerevisiae*

SOD — szuperoxid dizmutáz

S. pombe — *Schizosaccharomyces pombe*

t-BOOH — terciér-butil hidroperoxid

2. Irodalmi előzmények

2.1. A *Candida albicans* modellszervezet

2.1.1. A *Candida albicans* jellemzése

A *C. albicans* opportunista patogén mikroorganizmus, amely kommenzalistaként megtalálható az egészséges ember szájüregében, emésztőtraktusában és 20,7%-ban az egészséges nők hüvelyében is (Odds, 1988). Az egészséges emberben a gazdaszervezet és a gomba között fennálló egyensúly felborulhat és ez akár halálos kimenetelű szepszishez is vezethet. Az általa okozott kórképek sokfélesége miatt az egyik legveszélyesebb humán patogén gombának tekintik (Scherer és Magee, 1990).

Diploid, kromoszómaszáma 6-8, a természetben előforduló izolátumokat nagyfokú heterozigótaság jellemzi, sem szexuális, sem paraszexuális sejtciklusa nem ismert. Ezért, a *Fungi imperfecti* csoportba, *Ascomycotina*, *Deuteromycetes* családba tartozik (Odds, 1988; Scherer és Magee, 1990; Soll, 1992). A fentiek miatt a *Schizosaccharomyces pombe* és a *Saccharomyces cerevisiae* mellett a legintenzívebben vizsgált élesztőfaj.

2.1.2. A kísérletek során használt *C. albicans* vad *33erg⁺* és a szterin mutáns *erg-2* törzsek jellemzése.

Modellorganizmusként a *C. albicans*-t azért választottuk, mert rendelkezésünkre állt egy jól jellemzett, ergoszterint nem termelő (az American Type Culture Collection génbankban elhelyezett) mutánsa és annak szülői törzse, és ezért megfelelt azon célkitűzésünknek, hogy megvizsgáljuk a Cr(III) és a plazmamembrán kölcsönhatását, illetve a Cr(III)-nak a plazmamembrán összetételétől függő hatását (Pesti és mtsi., 1981; Pesti és mtsi., 1985). A *C. albicans* betegből izolált törzséből indukált mutagenézissel auxotróf és ergoszterint nem termelő mutánsokat állítottak elő, jellemezték ezen mutánsokat és meghatározták a mutánsok lipidösszetételét. (Pesti és mtsi., 1985).

A polién antibiotikumokra érzékeny *33erg⁺* *C. albicans* vad törzsből állítottak elő nisztatin rezisztens *erg-2* mutánst nitrozoguanidin kezeléssel (Pesti és mtsi., 1981). A polién antibiotikumok hatásmechanizmusának tanulmányozása során derült ki, hogy mivel minden gomba tartalmaz ergoszterint a sejtmembránjában, érzékenyek a polién antibiotikumokra, a poliének kötődése és a gomba sejtek ergoszterin tartalma között szoros összefüggés van. Ezek a mutánsok azért nagyon hasznosak, mert a megváltozott membrán szterin tartalmának segítségével jól tanulmányozható a szterinek fontossága a membránok felépítésében és

működésében. A sejtmembrán összetételének módosulását okozhatja a plazmamembránban lezajló folyamatok megváltozása a *C. albicans*-ban, amelyekért részben a membránhoz kötődő enzimek aktivitása is felelős. A kitin szintetáz, amely egy ilyen enzim, a plazma membránhoz kapcsoltn helyezkedik el (Pesti és mtsi., 1981).

A vizsgált négy polién antibiotikum (nisztatin, amfotericin B, kandicidin, piramicin) minimális gátló koncentrációja minden esetben a szterin mutánsban sokkal magasabb volt, mint a vad törzsben. Nisztatin esetében tizenháromszoros, amfotericin B-nél nyolcszoros, kandicidinnél és piramicinnél tizenhatszoros volt a különbség a mutáns javára. Az ergoszterin abszorpciós spektrumát vizsgálva, míg a vad törzsnél az ergoszterin jellegzetes négycsúcsú spektrumát mérték, addig a mutáns törzsnél ergoszterin nem volt kimutatható 262 és a 269 nm között. A szterin mutáns *erg-2* plazmamembránjának a merevsége nagyobb fokú volt, mint a szülői törzsé (Pesti és mtsi., 1985).

A foszfatidiletanolaminból, a foszfatidilinozitolból és a foszfatidsavból az *erg-2* mutáns tartalmaz többet, míg a foszfatidilszerinből a vad törzsben található nagyobb mennyiség. A kitin szintáz specifikus aktivitása, mind az enzim aktív és zimogén formájának az esetében a szterin mutánsban magasabb volt, mint a vad törzsben (Pesti és mtsi., 1985).

Számos kísérleti adat bizonyítja, hogy az élő szervezetek jelentős többségénél a vízben oldott Cr(III) számára a plazmamembrán átjárhatatlan (Standeven és Wetterhahn, 1989).

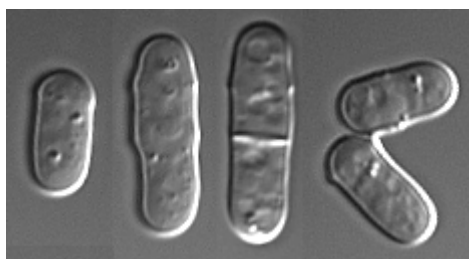
2.2. A *Schizosaccharomyces pombe* modellszervezet

2.2.1. A *S. pombe* általános jellemzése

1893-ban Paul Lindner kelet-afrikai, úgynevezett pombe, köles sörből izolált egy élesztőgomba törzset, melyet *Schizosaccharomyces pombe* néven írt le. Winge megállapította, hogy ez kiváló organizmus genetikai célú munkákhoz. Urs Leupold 1950-ben publikálta cikkében a *S. pombe* sejtciklusát és első genetikai analízisét. Előállította a ma is használatos laboratóriumi törzseket, az eredeti Lindner féle homotallikus h^{90} törzsből $L972h^-$ és $L975h^+$ heterotallikus törzseket izolált. Sörélesztőként ma már ritkán, de afrikai sörök készítéséhez, valamint a borászatban, mint az almasav lebontóját – mely a bor savasságát okozza – hasznosítják.

A biológiai kutatások számos területén kiváló modellszervezetnek bizonyult. Ezt annak köszönheti, hogy haploid és diploid állapotban egyaránt fenntartható, generációs ideje rövid, tenyésztése nem igényel speciális körülményeket, valamint a molekuláris genetika csaknem valamennyi módszere alkalmazható a kutatásában.

A *S. pombe* eukarióta aszkomicéta élesztő (1. ábra), aszkospórák képzésére képes. Vegetatív szaporodási formája az ún. hasadás. Sejtjeik általában hosszabb-rövidebb, végein lekerekített, henger alakúak. A sejtek hossza 7-15 μm , átmérőjük körülbelül 4 μm . A sejtet kívülről vastag sejtfa burkolja, ezen belül helyezkedik el a membránnal határolt citoplazma és a különféle sejt szervek, a membránnal határolt sejtmag, mitokondriumok, endoplazmatikus retikulum, vakuolumok és a Golgi-készülék (1. ábra).



1. ábra A *S. pombe* hasadással történő sejtosztódásainak fázisai

(www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/)

A *S. pombe* három kromoszómával (5,7; 4,6 és 3,5 Mb) rendelkező haploid élőlény, genomjának mérete 14 Mb. Genomja már szekvenálásra került nemzetközi program keretén belül (<http://genomic.sanger.ac.uk>). A haploid sejtek komplett táptalajon mitotikusan

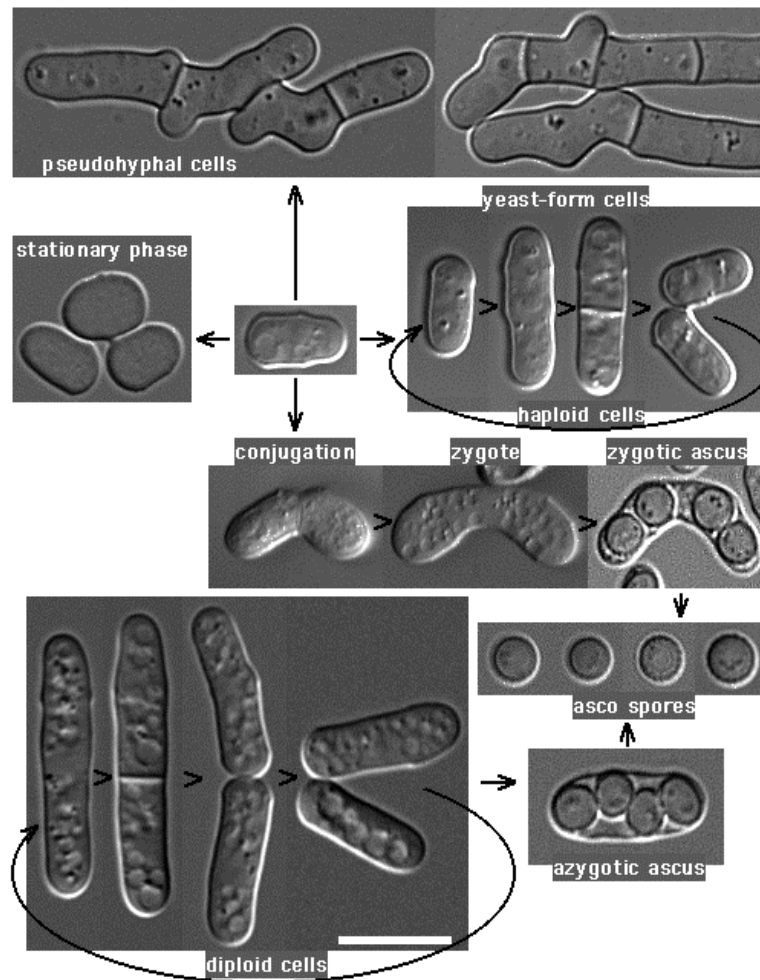
ponton elkülönül és aszkusz anyasejtté alakul. A magok egyesülnek kariogámiával, amelyet meiotikus magosztódás követ, végül a magok körül aszkospórák alakulnak ki az aszkuszon belül.

Vegetatív fázisban általában fonalas szerveződésűek, amely néha csak egy sejtre redukálódik (élesztő gombák), olykor dimorfak. Aszexuális szaporodásra konídiumokkal, ill. sarjadzással, vagy hasadással képesek. Az aszkomicéta fonalas gombák fő sejtfa alkotója a kitin, az élesztőkben β -1,3-glukán és a mannán a fő komponens (May és mtsi., 1986).

A *S. pombe* az *Ascomycota* törzsen belül a *Schizosaccharomycetales* rendbe tartozik, ezen belül a *Schizosaccharomycetaceae* családba. A *Schizosaccharomycetes*eket a *Saccharomycetes*ekkel és más valódi élesztőkkel együtt az *Endomycetales* rendbe sorolták annak ellenére, hogy kezdetől ismert volt, hogy egyes tulajdonságaik (szaporodás, spórázás módja, sejtfa összetétel) eltérőek. A család legismertebb faja a *S. pombe*, mind elméleti vizsgálatok (sejtciklus, genetikai kutatás), mind gyakorlat szempontjából igen fontos mikroszervezet.

2.2.3 A *S. pombe* életciklusa

A *S. pombe* sejteiben négy alternatív differenciálódási út játszódhat le: a haploid, a diploid vegetatív ciklus, a diploid szexuális ciklus, és a nyugalmi állapot (3. ábra). A sejteknek a sejtciklus G_1 fázisában kell választani a vegetatív és a szexuális ciklus közül. A vegetatívan szaporodó sejtek a tápanyagok elfogyását követően az éhezésre kétféle módon válaszolhatnak. Az egyik mód, hogy elindítják a szexuális ciklust, a másik nyugalmi, azaz G_0 fázisba lépnek (Beach és mtsi., 1985; Kelly és mtsi., 1988). A *S. pombe* sejtek G_1 vagy G_2 fázisból is beléphetnek a G_0 nyugalmi állapotba (Munz és mtsi., 1989).



3. ábra *A. S. pombe* életciklusa

(<http://www.bio.uva.nl>)

2. 3. A króm vegyületek hatásmechanizmusa

Napjainkban az iparban a krómvegyületek használata nagyon elterjedt, nagy mennyiségben használják az acéltermelésben, a favédő anyagok előállításában, a fémek korróziógátlásánál, bőrcserzésnél, festékek és színezékek előállításakor, fémbevonatok készítésénél. Ezért az ipari üzemeknek rendelkezniük kell szennyvíztisztítóval, csak ezután ereszthetik szennyvizüket a kommunális szennyvízhez. Az ipari üzemek szennyvizei általában csak kis mennyiségben vagy egyáltalán nem tartalmaznak szerves anyagot, ezért a szennyvíztisztítás hatékonysága nem mindig tökéletes, ezért a talaj és a felszíni vizek króm általi szennyeződése a mai környezetvédelem egy nagyon aktuális problémája. Éppen ezért a szennyvizek megfelelő tisztítása nagyon fontos a flórák és az ökoszisztémák épségének a

megőrzése érdekében, hogy a környezet a króm különböző mérgező vegyületei általi szennyezettsége minél kisebb mértékű legyen. Annak ellenére, hogy milyen káros az élőlényekre, fontos, hogy az ivóvíz tartalmazzon krómot, nagyon kis mennyiségben: 0,05 mg/l-t. Ez a szervezetben lezajló katalitikus folyamatok miatt szükséges.

Természetes vizes környezetben a króm vegyületek oxidációs állapotai közül a Cr(III) és a Cr(VI) a meghatározó. A Cr(III) só formája a $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Vizes oldatban, mint $\text{Cr}(\text{OH})_3$ (pH 6,2-11,5) formában van jelen. Komplexet képez többek közt a glutationnal, NADP-vel, aszkorbinsavval, ciszteinnel, aminosavakkal, savakkal, nukleotidokkal illetve ezek makromolekuláival. A Cr(III) számára a sejtmembrán gyakorlatilag átjárhatatlan mindkét irányba. A Cr(VI) a sejtbe kerülve Cr(III)-á redukálódik és *in vitro* kísérletek tanulsága szerint fehérje-fehérje, fehérje-DNS, DNS-DNS keresztkötéseket hoz létre. Millimólos koncentrációban gátolja a DNS replikációt, ennél alacsonyabb koncentrációban csökkenti a DNS átírás megbízhatóságát, ezáltal mutagén és karcinogén hatást idézhet elő (Langard, 1993; Costa, 1997).

Szemben a Cr(III) ionokkal a kromát [Cr(VI) ion (CrO_4^{2-})] fölvétele a sejtek által egy nonspecifikus anion transzporttal, az úgynevezett permeáz rendszeren keresztül történik, mely többek között a sejt számára nélkülözhetetlen SO_4^{2-} és PO_4^{3-} felvételét végzi. Néhány *Neurospora crassa* kromát rezisztens mutánsa erősen lecsökkent szulfát transzport tulajdonsággal rendelkezett. A felvétel típusa serkentett diffúzió, azaz egy olyan specifikus fehérjéről van szó, amely működéséhez nem igényel biológiai energiát, makroerg kötések. A felvétel addig történik az ilyen típusú transzporterek esetében, ameddig a biológiai membrán két oldalán az adott oxidációs állapotban azonos koncentrációt el nem ér a kérdéses ion. A beáramlást gátló vegyület a 4-acetamid-4'-izotiocianosztilben-2,2'-diszulfoniksav, a dietil-malát és a foron. A dietilmalát reagál az anion carrierek SH csoportjával, ezáltal gátolja a króm transzportot. A dietilmalát és a foron erősen gátolja még a glutation redox ciklust is. A közegészségügyi vizsgálatok és a legkülönbözőbb élő szervezeteken végzett kutatások bizonyították, hogy a Cr(VI) az egyik legerőteljesebben citotoxikus, genotoxikus és karcinogén vegyület (Borst-Pauwels, 1981; Wiegand és mtsi., 1985; Arslan és mtsi., 1987; Miller és mtsi., 1991; Snow, 1991; Cohen és mtsi., 1993; Katz és Salem, 1993; Shi és mtsi., 1999; Cervantes és mtsi., 2001).

Aaseth és mtsi. (1982) vizsgálták a humán eritrociták Cr(VI) és Cr(III) felvételét négy órás időintervallumban, melynek során a Cr(VI) majdnem teljes mennyisége bejutott a sejtekbe, míg a Cr(III)-nak ugyanezen idő alatt csak az 5%-a jutott be. A dietil malát az intracelluláris GSH-t elhasználja, ezáltal csökken a sejtek Cr(VI) felvétele.

Wiegand és mtsi. (1985) is végeztek méréseket eritrocitákkal, ők $^{51}\text{Cr(VI)}$ izotópot használtak. A nulla időpontban az izotóp 100 %-a a plazmában volt megtalálható, két óra elteltével az eritrociták az $^{51}\text{Cr(VI)}$ 85%-át felvették.

Ormos és Manyai (1977) szintén eritrociták Cr(VI) felvételét vizsgálta Sephadex gélen, és úgy találták, hogy a Cr(VI) 95%-át a hemoglobin kötötte meg. Ha csak a tiszta hemoglobint inkubálták Cr(VI)-tal, akkor a teljes Cr(VI) 55%-át kötötte csak meg, ha viszont adtak hozzá glutationt, akkor ez drámaian megnövelte a létrejövő kötések számát. Ormos és Manyai szerint a GSH jelenléte megnöveli a króm és a hemoglobin közötti kötések számát az ép eritrocitákban.

Norseth és mtsi. (1982) patkányokon végeztek kísérleteket, amelyek során intravénásan Cr(VI)-ot és Cr(III)-at injekcióztak az állatokba, a kísérlet során a patkányok a krómot kiválasztották az epében, mint Cr(III). Amikor dietil-maláttal és ciklohexán oxiddal kezelték a sejteket a Cr(VI) adás előtt, elhasználva a sejtek GSH tartalmát, a króm epés kiválasztása csökkent és az epében kizárólagosan mint Cr(VI) jelent meg. Így szerintük a GSH szerepe a Cr(VI) felvételben és redukálásban egyértelmű.

Rapoport és Muter (1995) *Candida utilis*-szel folytattak kísérleteket, melynek során a sejteket különböző mértékben szárították ki, majd inkubálták őket 18 órán keresztül Cr(VI) tartalmú pufferban. A kísérletek során azt tapasztalták, hogy a legkisebb nedvességtartalmú sejteknek volt a legnagyobb a Cr(VI) felvétele. Vizsgálták a felvétel hőmérsékletfüggését is 15, 30 és 45 °C-on, a Cr(VI) felvétel a 45°C-os hőmérsékleten volt a legmagasabb. Tanulmányozták a különböző mértékben kiszáritott sejtek életképességét is, melynek során a 18 órás kezelés alatt a 75%-os nedvességtartalmú sejtek életképessége lecsökkent 100%-ról 85%-ra. A legjobban kiszáritott sejtek sejtszáma a kezelés alatt ugyanannyi maradt. Az eredmények azt mutatják, hogy a dehidrált sejtek elnyelési kapacitása jóval nagyobb, mint a sértetlen sejteké. Kimutatták, hogy ezen sejtek sejtfalának megnőtt az elektronnegativitása, aminek a segítségével a pozitív töltésű fémionokat meg tudják kötni a sejtfelszínen, ezzel is csökkentve a bejutásukat és károsításukat. Az alacsonyabb rendű eukarióták sokféle módon védekeznek a Cr vegyületekkel szemben. A Cr(VI) rezisztens mikrobák két mechanizmusnak köszönhetik a rezisztenciájukat: 1, membrán sorompók a Cr(VI) ellen 2, a Cr(VI) redukciója Cr(III)-á. Egyrészt redukálják már a sejt felszínén a krómot, így oldhatatlan króm-hidroxid keletkezik, ami megvédi a sejteket a Cr(VI) toxicitásával szemben. A sejtfastruktúrája és töltése is fontos a fémek abszorpciójában. A gombák sejtfalában fontos szerepet kapnak az elágazó mannoproteinek, lipidek, pigmentek és potenciális fém-komplex helyek, mint például a karboxilát, foszfát, szulfhidril és amino csoportok. A baktériumok H_2S -t termelve

védekeznek a nehézfémekkel szemben, amely mint fémcsapda fejt ki a hatását. A *S. pombe* ciszteinben gazdag γ -glutamil peptideket termel (Standeven és mtsi., 1989)

A Cr(VI) redukálásában részt vevő legfontosabb molekulák: hisztidin, glutation, cisztein, aszkorbinsav, glükán, riboflavinok; enzimek közül a citokróm-P450, DT-diaforáz és a mitokondriális elektron transzport lánc enzimeit. A Cr(VI) redukálása során reaktív intermedierek keletkeznek, pl.: Cr(V), Cr(IV), Cr(III) és \bullet OH gyök. A baktériumok H_2S -t termelnek, és ennek segítségével tudják redukálni a Cr(VI)-ot Cr(III)-á. A H_2S az elektron donor szerepét tölti be, és így a Cr(VI) redukálódik Cr(OH)₃-á. Az élesztő és emlős sejtekben a millimólos mennyiségben jelenlevő GSH-nak elsődleges szerepet tulajdonítottak a Cr(VI) redukcióban. EPR méréseket is végeztek a Cr(VI) és Cr(V) kimutatására. Így figyelték meg, hogy a Cr(V) jel intenzitása és a Cr(VI) indukálta DNS szál törések mennyisége csökkent, amikor a V-79 sejtekhez a Cr(VI) kezelést megelőzően E-vitamint adtak. Viszont, ha előkezelték a sejteket nátrium szelenittel, amely megnövelte a GSH mennyiségét a V-79 sejteknél, nagyobb mértékű Cr(VI) indukálta DNS szál törést figyeltek meg (Liu és mtsi., 1997; Sugiyama és mtsi., 1989).

Cupo és Wetterhahn (1985) közvetlen kapcsolatot fedezett fel a celluláris GSH szint (mely módosítva volt N-acetil-L-ciszteinnel) és a DNS szál törések mennyisége között a kromáttal kezelt csirke embrióban. Ezek a tanulmányok bizonyítják a GSH szerepét a Cr(VI) anyagcserében és a Cr(VI) indukálta DNS sérülést a biológiai rendszerekben.

Az aszkorbinsav is képes redukálni a Cr(VI)-ot *in-vitro* körülmények között pH 7,4-en. Suzuki és Fukuda (1990) felnőtt patkány tüdőben vizsgálta az aszkorbinsav szerepét a Cr(VI) redukcióban. Úgy tapasztalták, hogy a Cr(VI) redukciója a tüdőben nagyon gyors volt, valamint, hogy az aszkorbinsav jelentősen hozzájárult a redukcióhoz.

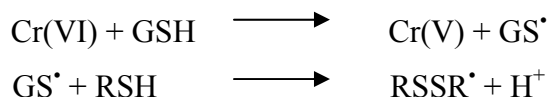
Gruber és Jennette (1978) az első bizonyítékát szerezte meg a Cr(VI) enzimatisz redukálásának. Amikor a Cr(VI)-ot együtt inkubálták mikroszómákkal és NADPH-val, akkor Cr(III) keletkezett, ha viszont a Cr(VI)-ot csak az egyikkel inkubálták együtt, akkor csak viszonylag kis mennyiségben történt Cr(VI) redukció. Garcia és Jennette (1981) kimutatta, hogy a citokróm P-450 enzimnek a mikroszómákban végbemenő Cr(VI) redukcióban szerepe van, mégpedig úgy, hogy a Cr(VI) redukció csökkent szén-monoxid és metirapon adása után, ami ismert P-450 gátló.

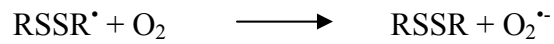
Izolált mitokondriumok is képesek Cr(VI) redukcióra. Az elektron transzport lánchoz szükséges szubsztrátok növelik, míg az elektron transzport lánc gátlói csökkentik a Cr(V) formát, ez azt mutatja, hogy az elektron transzport lánc komplexeinek szerepük van a Cr(VI) redukcióban. Patkány timociták Cr(VI)-al való kezelése során csökkent az ATP szint és az

oxigén fogyasztás aránya. Ezért valószínűsíthető a mitokondriumok szerepe a Cr(VI) redukcióban (Rossi és mtsi., 1988).

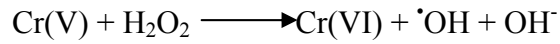
A Cr(VI) redukciója során az egyik intermedier a Cr(IV). Cr(VI) és GSH reakciója során keletkezik a Cr(IV)-GSH komplex (Liu és mtsi., 1996). A komplexképzés akkor a leghatékonyabb, ha a Cr(VI) és a GSH aránya 1:2. Ez a Cr(IV)-GSH komplex hidroxil gyököt ($\cdot\text{OH}$) képes termelni molekuláris oxigén jelenlétében vizes közegben. A kataláz gátolja a $\cdot\text{OH}$ gyök termelését, míg a H_2O_2 növeli azt, jelezve, hogy a $\cdot\text{OH}$ gyök Fenton-szerű reakció útján termelődik, a H_2O_2 pedig a molekuláris oxigén redukciója során, mint köztes termék keletkezik. Fém-ion kelátorok, mint a deferoxamin és a 1,10-fenantrolin, csökkentik a Cr(IV) által közvetített $\cdot\text{OH}$ gyök termelését. Újabb tanulmányok igazolták a Cr(VI) *in vivo* redukcióját egérben Cr(V)-öt termelve. Ez megalapozta, hogy a Cr(V) képes termelni $\cdot\text{OH}$ gyököt H_2O_2 -ből Fenton-szerű reakció útján. A Cr(IV) is képes termelni $\cdot\text{OH}$ gyököt Fenton-szerű reakción keresztül ($\text{Cr(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cr(V)} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$). Ez a Fenton-szerű reakció a Cr(IV) közvetítésével magasabb arányban történik, mint Cr(V) esetében. Liu-ék a hidroxil gyökök kimutatására az EPR módszert alkalmazták. Jelölőnek 5,5-dimetil-1-pirrolin N-oxidázt (DMPO) használtak. A legnagyobb jelet akkor kapták, amikor a pufferban Cr(IV)-GSH, H_2O_2 és DMPO volt. Ha etanolt adtak az oldathoz, akkor a jel jóval lecsökkent, mivel az etanol másodlagos csapdája a hidroxil gyöknek. Ha etanol helyett deferoxamint vagy 1,10-fenantrolint adtak a Cr(IV)-GSH és a H_2O_2 mellé, a jel akkor is lecsökkent. A Cr(IV)-GSH egyedül, csak a DMPO-val elég kicsi jelet ad, viszont ha megnövelték a Cr(IV)-GSH mennyiségét 2,5 mg/ml-re, akkor a DMPO/ $\cdot\text{OH}$ -ra jellemző 1:2:2:1 negyedleges arányt figyelték meg, vagyis a Cr(IV) egyedül is képes volt termelni hidroxil gyököt. Kataláz adására ez a jel teljesen eltűnt. Így Liu-ék kijelentették, hogy a Cr(IV) hidroxil gyököt képes termelni molekuláris oxigén jelenlétében vizes közegben egy Fenton-szerű reakció által.

A sejten belüli folyamatokat az alábbi 5. ábra szemlélteti vázlatosan. Ezen látható folyamatok elsősorban *in vitro* kísérletek eredményeként váltak ismertté, amely témát Shi és mtsi. 1999-ben részletesen összefoglaltak. A Cr(VI) elektronfelvétellel járó redukciója átmeneti reaktív oxigén gyököket valamint a Cr(V)-öt és a Cr(IV)-et hozza létre, melyek rövid felezési idejűek és GSH komplex formájában léteznek. Közben olyan glutation gyök keletkezhet, amely már sejtkárosodást okozhat és más tiol molekulákkal szuperoxid-gyököt ($\text{O}_2^{\cdot-}$) termel.



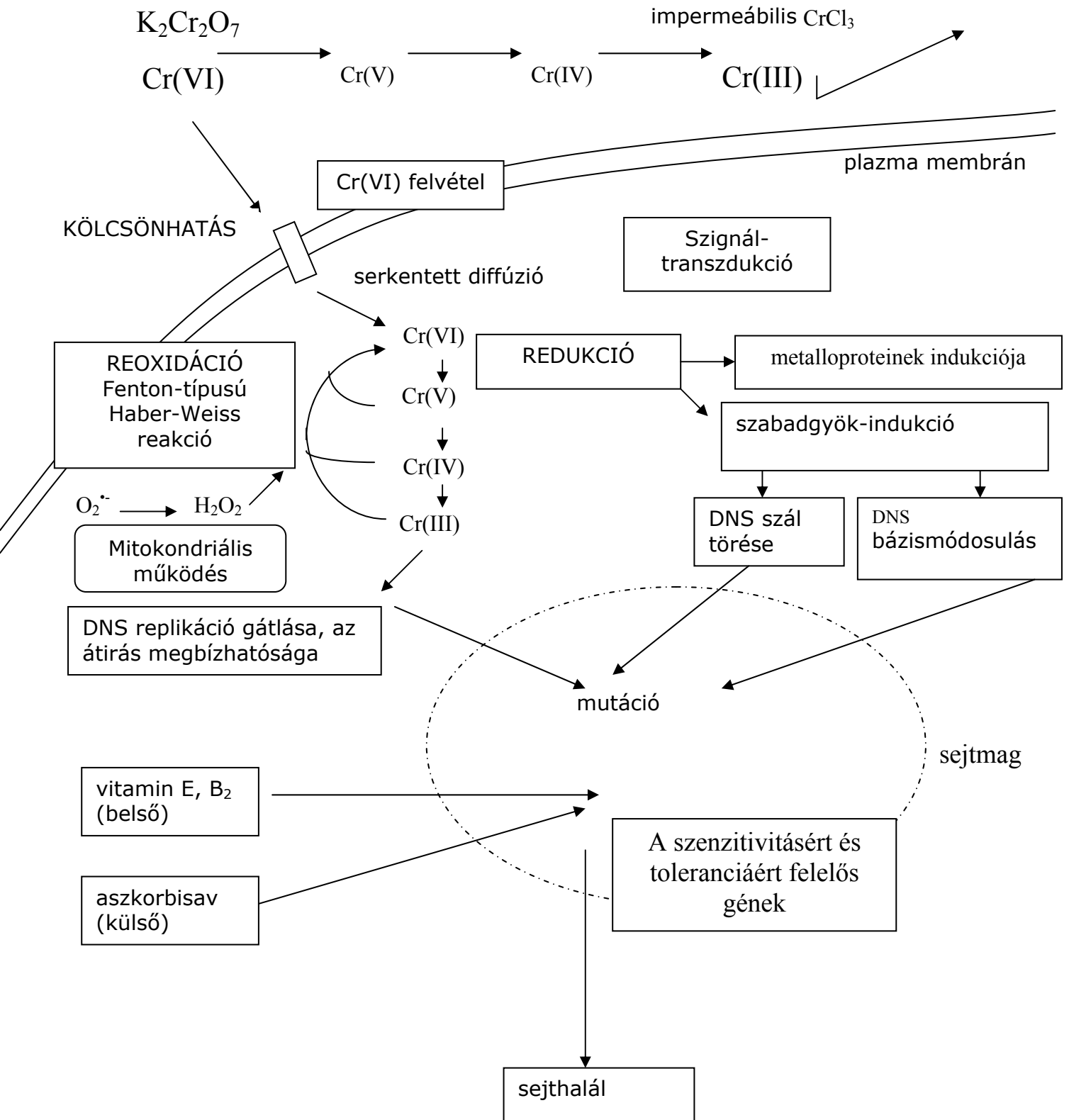


Redukció folyamán a keletkező Cr(V) a sejtben természetes úton létrejött hidrogén-peroxiddal Fenton típusú reakcióba lép $\cdot\text{OH}$ gyök képzése közben.



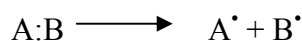
Közismert, hogy a hidroxil-gyök a legreaktívabb a szabad gyökök közül és enzimatis védelemmel a sejt nem rendelkezik vele szemben. Kölcsönhatásba lép a sejt valamennyi fontos makromolekulájával, így a DNS módosítása mellett DNS lánc-törést okoz, amellyel jelenleg magyarázzuk mutagén és karcinogén hatását valamennyi élőlény esetében (Gille és Sigler, 1995).

4. ábra: A krómvegyületek hatásmechanizmusa



2.4. Reaktív oxigén gyökök

A legtöbb kémiai anyag elektronorbitáljai páros elektronokkal telítettek, melyeknek ellenkező irányú spinjük van. A szabad gyökök olyan molekulák, amelyek külső orbitálja egy egyedül álló, párosítatlan elektront tartalmaz. Mivel az elektronok párképződésre hajlamosak, egy ilyen párosítatlan elektron jelenléte bizonyos feszültséget hoz létre a szabad gyökben és partner keresésére készíti. Kémiaailag reaktívak, élettartalmuk rövid. Néhány közös molekula, mint a nitrogén-oxid (NO) és a nitrogén-dioxid (NO₂), a külső orbitálján egy párosítatlan elektront tartalmaz normál állapotban is, így definíció szerint szabad gyöknek számít. Biradikális (kettős szabad gyök) egy olyan kémiai anyag, amely két párosítatlan elektront tartalmaz külső orbitáljain, mint pld. a molekuláris oxigén. A gyökion egy pozitív vagy negatív töltésű szabad gyök. Míg egy kémiai anyag ion voltát elektronjainak protonjaihoz viszonyított száma határozza meg, szabad gyök a protonok számától függetlenül minden olyan kémiai anyag, amelynek külső elektronorbitálján egy párosítatlan elektron van. Sok reakció kezdete (iniciációja) a két elektronos kémiai kötés bomlásából áll. A kémiai kötés elhasadhat szimmetrikusan, amikor is a termékek szabad gyökök lesznek, vagy asszimmetrikusan, amikor ionok keletkeznek (Halliwell és Gutteridge, 1999).



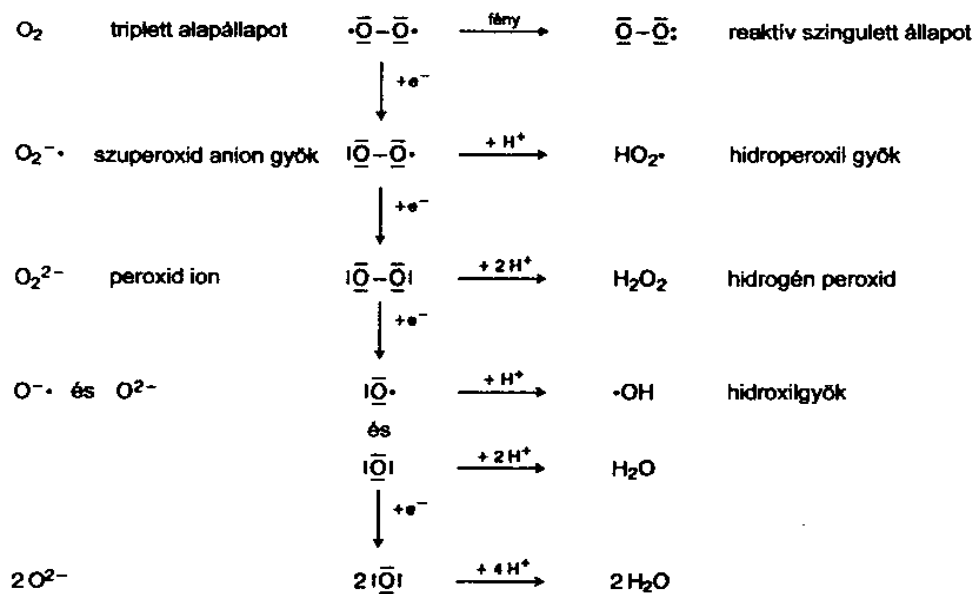
Egy kémiai anyagot többféle módon, fizikai eszközökkel (UV) vagy más iniciátornak nevezett kémiai anyaggal hozhatunk a szabad gyök állapotába. A szabad gyök reakciók általában láncreakciók.

2.4.1. A molekuláris oxigén.

Alapállapotában biradikális, két paralell spinű párosítatlan e⁻-t tartalmaz külső orbitálján. A párosítatlan e⁻-ok spinelrendeződése megakadályozza az e⁻ pár direkt addícióját egy adott molekulához, meggátolva kémiai kötés képződését. A kötéseképződéshez előbb egy elektronspin megfordulásnak kell létrejönnie. Mivel a spin megfordulási folyamata lassú az aktiválási komplexek élettartalmához viszonyítva, ez azt eredményezi, hogy a molekuláris oxigén alapállapotában relatíve gyenge oxidáns.

Az oxigén molekula magas redukciós potenciállal rendelkezik, ezáltal igen jó oxidálószer. Bár a molekuláris oxigén fiziológias hőmérsékleten igen inert, de katalizátorok segítségével képes reagálni. Az alacsony reakciókészség oka a különleges elektronszerkezete. A két legkülső párosítatlan elektron úgynevezett degradált π -pályán helyezkedik el, két egyelektronos π -kötést alkotva. Így az oxigénmolekulában egy szigma- és két fél pi-kötés van. Kettős kötésről csak akkor beszélhetünk, ha elnagyolt egyszerűsítésként a két fél π -kötést egy π -kötéssel egyenértékűnek tekintjük. A két parallel spin paramágneses tulajdonságot ad az alapállapotú O_2 -nek.

A molekuláris O_2 -ből keletkező gyökök az élővilágra, de az élettelen természetre is komoly veszedelmet jelentenek. A 5. ábrából kitűnik, hogy a gerjesztés, illetve redukció során keletkező reaktív intermedierek nem mind szabad gyökök (pl. a deltaszinglett oxigén vagy a H_2O_2 definíció szerint nem szabad gyök), gyökreakciók során keletkezhetnek, reaktivitásuk és jelentőségük a szabad gyökökéhez hasonló, ezeket reaktív oxigén fajtáknak (ROS) nevezzük.



5. ábra Az oxigénmolekula különböző oxidációs állapotai (Sigler és Gille, 1995)

Az oxigén komplett tetravalens (4 elektronnal történő) redukciója során víz keletkezik. Ha szekvenciális, univalens (1 elektronos) redukciókon megy keresztül, akkor reaktív intermedierek keletkeznek, amelyek károsíthatják a biológiai rendszereket. Ilyen intermedier pl. a szuperoxid aniongyök ($O_2^{\cdot-}$), a H_2O_2 , és a hidroxilgyök.

Az élőlényekben ezért olyan oxidatív enzimek fejlődtek ki, amelyek képesek a spinrestrikció elvének megkerülésével az oxigén divalens és tetravalens redukciójára úgy, hogy közben csak minimális mennyiségben szabadul fel ROS. Ilyen enzim a citokróm oxidáz, amely az oxigén tetravalens redukcióját hajtja végre, és amelynek működése felelős a sejtlégzés során elfogyasztott oxigén döntő részéért. Mégis, a sejtlégzés során kis mennyiségben állandóan keletkezik ROS, amelyeket azonban normális körülmények között a védekező rendszerek semlegesíteni tudnak.

2.4.2. A ROS-ok eredete:

1. Légzés. Az oxigén nem teljes (4 elektronos) redukciója ROS képződéshez vezethet. Ez a legfontosabb forrása a ROS-nak. A légzés során az oxigén 1%-a szuperoxiddá alakul, amely diszporcionálódva (SOD-ok által) hidrogén-peroxidot termel.
2. Zsírsvanyagcsere. A peroxisómális zsírsavlebontás az acil-CoA dehidrogenáz révén hidrogén-peroxidot hoz létre. E mellett a telítetlen zsírsavak kialakulása szintén molekuláris oxigén redukciójával jár, ezért itt is képződhet ROS.
3. Oxigenázok (pl. purin, pirimidin anyagcsere, xenobiotikumok lebontása stb.) is termelnek ROS-t. A xantin dehidrogenáz oxidálódva, vagy proteolitikus átalakulás után xantin oxidázként funkcionál. Ilyenkor NAD helyett O_2 -t használ elektron akceptorként és szuperoxidot termel húgysav képződése közben.
4. A NADPH-oxidáz szintén szuperoxidot generáló enzim.
5. A fotoszintézis során elsősorban szinglet oxigén keletkezik nagy mennyiségben a nem megfelelő fotokémiai reakciók miatt.
6. A hidroxil szabadgyök legnagyobb mennyiségben hidrogén peroxidból és szuperoxid gyökből keletkezik egy az átmeneti fémek (pl. Fe, Cu, Zn) által katalizált reakcióban.

Oxidatív stressz kialakítása laboratóriumi körülmények között:

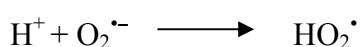
- Hidrogén-peroxid, szerves peroxidok (pl. *tert*-butil hidroperoxid, kumén-hidroperoxid, lipid peroxidok).
- Menadion, paraquat, xantin-oxidáz, melyek szuperoxid generáló ágensek.
- Diamid (csak oxidál, ROS-t nem generál, a glutationnal reakcióba lépve kötődik hozzá és ezt a komplexet a sejt eltávolítja) (Halliwell és Gutteridge, 1999).

2.4.3. A szuperoxid gyök ($O_2^{\cdot-}$).

A legtöbb szuperoxidgyök a mitokondriális elektron ranszport lánc működése során keletkezik, de további jelentős forrásai az endoplazmatikus retikulum és a kloroplasztisz.

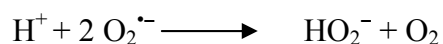
Fagociták működése során a NADPH-oxidáz működése következtében is keletkezik, valamint vegyületek autooxidációjakor. A $O_2^{\bullet -}$ maga korlátozott mértékben reaktív, mivel azonban oxidálni tud átmeneti fémkomplexeket, organikus szubsztrátokat, kapcsolódni képes fémekhez, ezért más reaktívabb oxigénintermedierré is alakulhat. A fehérjék Fe-S klasztereit (4Fe-4S típust) teszi tönkre a Fe(III) redukálásával. A felszabaduló vas további károsodásokat okozhat (ld. Fenton, Haber-Wies reakciók). Ráadásul ezt a vasat a sejtek nem képesek újrahasznosítani, így a Fe-S klaszterű fehérjék új szintézise vashiányt okoz.

Savas közegben, mint amilyen a fagocita vakuólum vagy a sejtmembránok mikrokörnyezete, protonálódik perhidroxilgyökké (HO_2^{\bullet}).



A HO_2^{\bullet} erősebb oxidáns, mint a $O_2^{\bullet -}$ és citotoxikusabb.

A szuperoxid vizes közegben gyorsan diszproporcionálódik molekuláris oxigénné és hiperoxid anionná.



Tiolok szuperoxiddal, miután az S-H kötések savasabb jellegűek a OH kötésnél, könnyebben oxidálódnak.

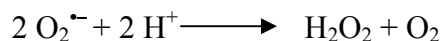


Az NH vegyületek kötése energiája lényegesen kisebb az O-H és C-H kötésekénél, ezért a proton lehasítása is könnyebb. A szuperoxid mennyiségét meg tudjuk mérni EPR spektroszkópiával, optikai és tömeg spektroszkópiával is.

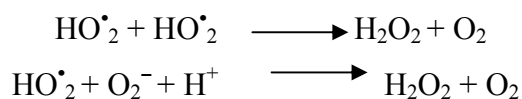
2.4.4. Hidrogén peroxid (H_2O_2).

Keletkezhet:

- a molekuláris oxigén divalens redukciójával (glükóz oxidáz),
- $O_2^{\bullet -}$ -ből SOD-ok által:



- hidroperoxil gyökből:



- xantin oxidáz segítségével,

Legkevésbé reakcióképes primer terméke számos oxidáz reakciónak. Párosítatlan elektronjai nincsenek, ezért nem szabadgyök, és nem is paramágneses, de két negatív töltésű. Viszonylag stabil, így akumulálódhat a sejtekben és képződésének helyétől távolabbra is diffundálhat.

Élettani szerepe jelentős lehet, pl.:

- granulociták termelik fagocitózis során,
- *Streptococcus sanguis* hidrogénperoxidot termel, így akadályozza meg más organizmusok növekedését.

Képződése a mitokondriumokban is gyakran lejátszódó folyamat. A H₂O₂ könnyen oxidál biológiailag fontos vegyületeket, pl.: telítetlen zsírsavakat, tiolokat, a fehérjék Cys és Met oldalláncait károsítja.

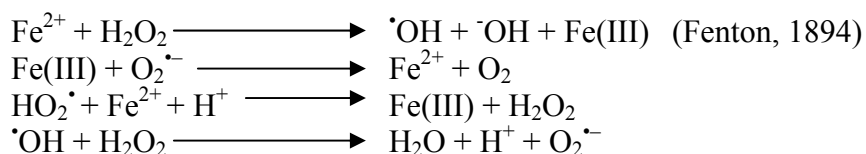
A fémkatalizált reakciója Fe²⁺ ionnal a rendkívül reakcióképes [•]OH gyök képződéséhez vezet.

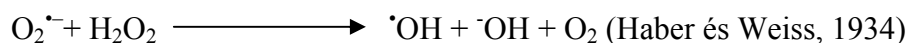
2.4.5. [•]OH (hidroxilgyök)

A potens oxidáns [•]OH keletkezésében az ún. Fenton típusú Haber-Weiss reakciónak tulajdonítottak szerepet, amelyben O₂^{•-}-ből és H₂O₂-ből keletkezik az igen reaktív [•]OH gyök.

Ez a reakció azonban az élő szervezetekben nagyon lassan megy végbe, így ezáltal jelentős mennyiségben nem keletkezhet [•]OH. A hidroxilgyök a sejt minden molekulájával képes reagálni: cukrokkal, aminosavakkal, foszfolipidekkel, más szerves savakkal. A sejtekben nem akumulálódik. 1934-ben Haber és Weiss figyelték meg, hogy O₂^{•-} és hidrogén-peroxid reakciójából közvetlenül származhat hidroxilgyök.

Ez a Haber-Weiss reakció volt az első, kémiai rendszerben hidroxilgyök termelést leíró egyenlet. Később észrevették, hogy vizes közegben ennek a reakciónak a sebessége állandó, hacsak nincs jelen megfelelő mennyiségű fém (pl. vas), ami semleges pH-n a reakció sebességét 10⁴-szeresére növeli.

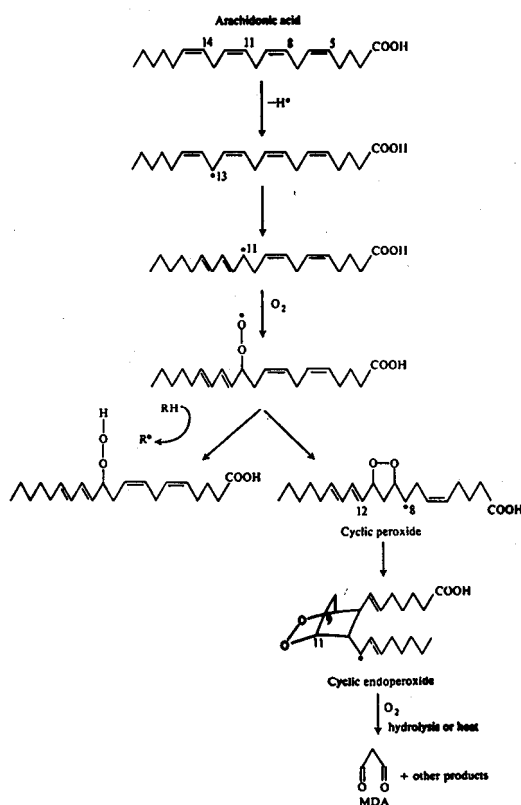




Így már jelentős mennyiségű $\cdot\text{OH}$ keletkezhet. Az $\cdot\text{OH}$ az ismert legaktívabb oxidálószer. A gyök a víz radiolízisével is képződik. Ez a biológiai rendszerek besugárzása során is fellép. A hidroxilgyök nagy reakciókészsége miatt a keletkezési helyétől nem juthat messzire, szinte ugyanott elreagál (Halliwell és Gutteridge, 1999).

2.4.6. A lipid-peroxidáció.

A ROS-ok a lipidek láncreakció-szerű peroxidálódását okozzák. Elsősorban a telítetlen zsírsavláncokat támadják karbon szabadgyököt létrehozva ($\equiv\text{C}^\bullet$), ami oxigén jelenlétében peroxil szabadgyökké ($\equiv\text{COO}^\bullet$) és ezen keresztül alkoxil szabadgyökké ($\equiv\text{CO}^\bullet$) alakul. Ezek szintén képesek H atomot elvonni a környezetükben lévő atomoktól, így láncreakciót indítanak be; vagy lánc törést indukálnak aldehideket létrehozva. A képződő aldehidek és dialdehidek (pl. malondialdehid) szintén toxikusak. DNS, RNS és fehérje károsodásokat okozhatnak, pl. primer amino-csoportokhoz kapcsolódva.

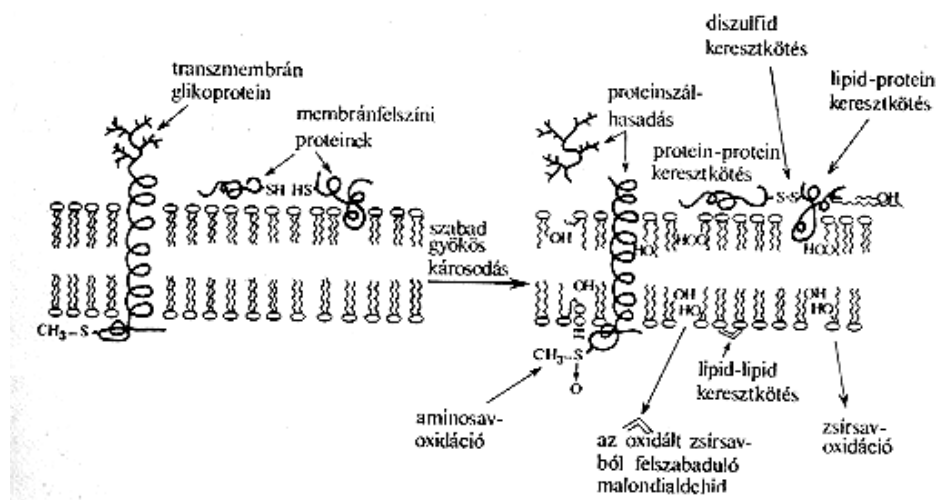


6. ábra A lipid-peroxidáció folyamata (Halliwell és Gutteridge, 1999).

A ROS a fehérjék aggregációját (keresztkötések kialakulása) és fragmentációját (peptid lánc megszakadása) is okozhatja. Elsősorban az α C atomot oxidálja (de az oldallánc C atomjait is megtámadhatja) karbon szabadgyököt ($\equiv\text{C}^\bullet$) létrehozva. Ezekután hasonló folyamat zajlik le,

mint a lipidperoxidációnál, amelynek során alkoxil szabadgyök ($\equiv\text{CO}^\bullet$) alakul ki. Itt is láncreakciót indítanak be, vagy lánc törést indukálnak. Ezen túl, hidroxilezi a Phe-t, Tyr-t és Arg-t és keresztkötéseket alakít ki Tyr-ok, Hys-ek és Lys-ek között.

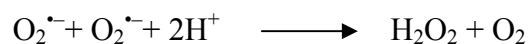
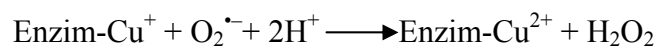
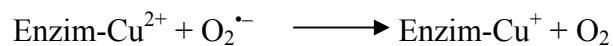
Nukleinsavakban a cukor részen karbon szabadgyököket hoz létre, ami lánc töréshez, keresztkötések kialakításához vezet. A bázisokat is módosíthatja, leggyakrabban 8-, 6- és 5-hidroxi-guanin képződését előidézve.



7. ábra Szabadgyökök okozta membránkárosodás (Rubbo és mtsi., 1994).

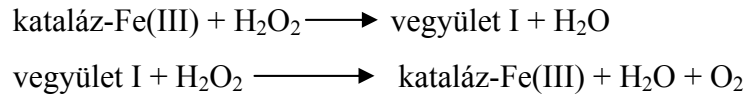
2.4.7. A ROS ellen védő enzimek

A $\text{O}_2^{\bullet-}$ semlegesítését a **szuperoxid-diszmutázok** (SOD-ok) végzik, amelyek metalloproteinek, Mn-t, Fe-t vagy Cu+Zn-t tartalmaznak (MnSOD, FeSOD, CuZnSOD). FeSOD a prokariótákban, MnSOD a pro- és eukariótákban, CuZnSOD csak az eukariótákban található meg. Az eukarióták mitokondriumában csak MnSOD van, míg a citoszólban csak CuZnSOD, kivéve a főemlősöket, amelyek citoszóljában MnSOD is megtalálható (Fridovich, 1989). A SOD-ok a következő reakciót katalizálják:

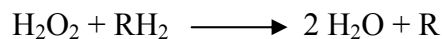


A mitokondriális légzési lánc működése során keletkezett $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t az MnSOD H_2O_2 -dá alakítja és ez állandóan kis mennyiségű H_2O_2 termelését jelenti a sejtben (Galiazzo és mtsi., 1994).

A H_2O_2 semlegesítésére egy hem enzim, a **kataláz** (CAT) és különböző **peroxidázok** (GPx) szolgálnak. A kataláz a peroxiszómákban helyezkedik el és a következő reakciót katalizálja:



A *Saccharomyces cerevisiae* két katalázzal rendelkezik, kataláz A-val és kataláz T-vel. A kataláz A a peroxiszómákban található és a zsírsavak β -oxidációja során keletkező H_2O_2 eltávolítása a feladata, a kataláz T a sejtplazmában található (Jamieson, 1998). A kataláz kis intracelluláris H_2O_2 koncentráció esetén relative nem aktív, továbbá lokalizációja a peroxiszómákban is azt valószínűsíti, hogy ilyenkor más védekező rendszer felelős a H_2O_2 semlegesítéséért. Ilyen enzimek a peroxidázok, melyek a következő reakciót katalizálják:



Ez H_2O_2 -t bont le redukálószerrel felhasználásával. Ilyen enzim a szeléndependens **glutation-peroxidáz**, amely a citoszólban és a mitokondriumban helyezkedik el, az egyik fontos tiolrendszer, mely redukált glutation felhasználásával működik. Az élesztők az emlősök glutation peroxidázaival szemben szelenociszteint nem tartalmaznak, képesek a hidrogénperoxid és a szerves peroxidok mellett a nem vízdékony, foszfolipid peroxidokat is elbontani, így igen nagy szerepük van a membránkárosodások megakadályozásában oxidatív stressz alatt. A redukált glutation direkt $\cdot\text{OH}$ „scavenger” aktivitását is feltételezik. A GPx kis H_2O_2 koncentráció esetén a fő védekező rendszer, de a H_2O_2 toxikus nagy koncentrációi esetén a kataláz is működésbe lép. A SOD és a peroxidáz, illetve a SOD és a kataláz együttesen képesek a terminális-oxidáz szerepet is betölteni, azaz $\text{O}_2^{\cdot-}$ -ből vizet képezni (Gille és Sigler, 1995; Jeong és mtsi., 2001).

A H_2O_2 és alkil-hidroperoxidok redukálásában a **tioredoxin-peroxidáz** is részt vesz, tioredoxint felhasználva, az oxidálódott tioredoxinok visszaredukálását a tioredoxin reduktáz végzi NADPH felhasználásával (Watson és mtsi., 2004).

2.4.8. Antioxidáns molekulák

Az eukarióta sejtek nagy számban tartalmaznak antioxidáns molekulákat, amelyeknek kisebb-nagyobb szerepe van ROS elleni védelemben. Ezek az alábbiak:

A-vitamin: antikarcinogén hatású, telítetlen zsírsav tartalmával van összefüggésben antioxidáns hatása. Alternatív utat nyit a lipidperoxidációnak. Ezen kívül fémkelátor tulajdonsága hozzájárul antioxidáns, antikarcinogén hatásához. Kapcsolatot mutattak ki az A-vitamin hiánya és a tüdőrák között, felvetette azt a lehetőséget, hogy A-vitamin felvételének a növekedése védőhatást gyakorol a dohányfüst karcinogénjeivel szemben.

E-vitamin: antioxidáns hatását a sejtmembránban elhelyezkedve fejt ki azáltal, hogy a hidroperoxidoknak hidrogént ad le, így ezek képződését megakadályozza. Ennek következtében a láncreakciót megszakítva meggátolja a patológiás szabadgyök-reakció kiterjedését.

Glutation: a már létrejött hidroperoxidok elbontásával fejt ki antioxidáns hatását oly módon, hogy közben nem keletkeznek gyöktermékek.

Tioredoxin: peroxidok redukcióját végzi, bár a sejtek ezredannyit vagy még kisebb mennyiségben tartalmazzák, mint a glutation.

Glutaredoxin: működése hasonló a tioredoxinhoz, valamint ez a molekula is 2 cisztein aminosavval rendelkezik. Fontos elektron forrása a ribonukleotid reduktáz enzimnek az élesztőkben.

Fitokelatinok: a GSH-ból szintetizálódnak a fitokelatin szintetáz enzim segítségével ((γ -Glu-Cys)_nGly).

Metallotioneinek: ciszteinben gazdag kis molekulatömegű fehérjék.

C-vitamin (aszorbinsav): erős redukálószer, könnyen elveszti hidrogénatomjait. Részben láncmegszakító antioxidáns: a peroxigyökökkel reagálva stabil monodehidro-aszkorbát keletkezik belőle, egyik H-jének leadása után. Ezen kívül direkt O[•]₂ illetve [•]OH gyökfogyó „scavenger” hatása is van, ROS-al történő reakció után monodehidro-aszkorbát illetve dehidro-aszkorbinsav (2H atom leadása után) keveréke keletkezik belőle.

D-penicillamin: fémkelátor hatású (a hidroperoxidok bomlását elősegítő fémkatalízist meggátolja).

K-vitamin: redoxireakciókra képes kinonstruktúrája szintén antioxidáns hatással ruházza fel.

Ubikinon: szerkezete az E-vitaminéhoz és a K-vitaminéhoz hasonló, a mitokondriális légzőlánc tagja.

Szelénium: a szeléndependens glutation-peroxidáz enzim alkotórésze.

Tiolok: általában gátolják a gyökreakciókat azáltal, hogy az -SH csoport H-jének elvonását lehetővé teszik. A keletkező tiol gyök (-S[•]) azután egy másik hasonló gyökkel reagálva diszulfidot (-S-S-) képezhet.

Glükóz: gyenge $\cdot\text{OH}$ gyökfogyó hatású, mivel az extracelluláris térben fiziológiásan is nagy koncentrációban van jelen a szervezetben, így hatása számottevő lehet (Pócsi és mtsi., 2004; Halliwell és Gutteridge, 1999.).

2.4.9. A glutation, mint fő antioxidáns az élő szervezetekben

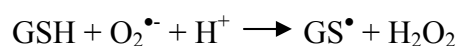
Minden élőlény nagy mennyiségben tartalmaz legalább egyfajta, kis molekulatömegű tiolt, amelynek fontos szerepe van az életfolyamatokhoz szükséges redoxmilió kialakításában. A legáltalánosabban elterjedt ilyen molekula a glutation (GSH) (L- γ -glutamil-L-ciszteinil-glicin), számos élőlény, a GSH mellett, vagy helyette, gyakran a GSH-hoz szerkezetileg igen hasonló, kéntartalmú vegyületet tartalmaz, ilyen a tioredoxin. Az élesztő sejtekben a GSH koncentrációja magasabb, mint 10 mM (Penninckx, 2002).

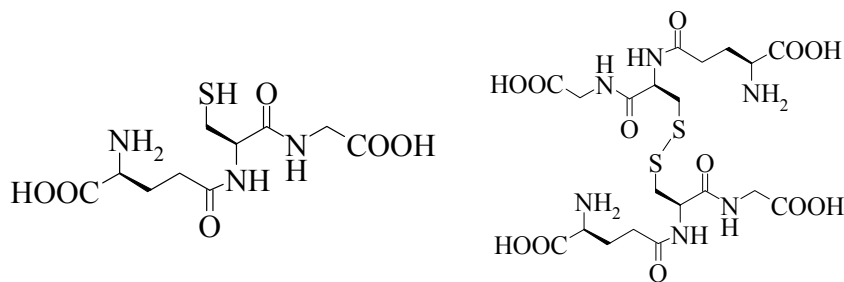
Szintézise két lépcsőben történik. Ciszteinből és glutamátból a γ -glutamilcisztein szintetáz segítségével képződik a γ -glutamilcisztein, amelyből glicin hozzáadásával a glutation szintetáz termeli a glutationt. A GSH lebontása ugyanígy két lépésből áll. Működésében nagyon fontos szerepe van a tiol csoportnak, mivel ide kapcsolódnak a toxikus anyagok, valamint a szabad gyökök redukálásában ez a csoport vesz részt.

Szerepe nagyon sokrétű, a fő antioxidáns funkciója mellett számos más funkciója is van:

- aminosavak és oligopeptidek transzportja,
- bioreduktív reakcióban vesz részt,
- kén anyagcsere, tárolása, szállítása,
- méregtelenítés,
- reaktív oxigén gyökök elleni védekezés, H_2O_2 lebontás,
- xenobiotikumok és más toxikus molekulák detoxifikálása,
- GSH-t felhasználva szintetizálódnak a nehézfémekkel kelátokat képező fitokelatinok (γ -L-glutamil-L-ciszteinil)_n-glicin,
- redoxaktív, oxidációs stresszt okozó nehézfémek ellen véd.

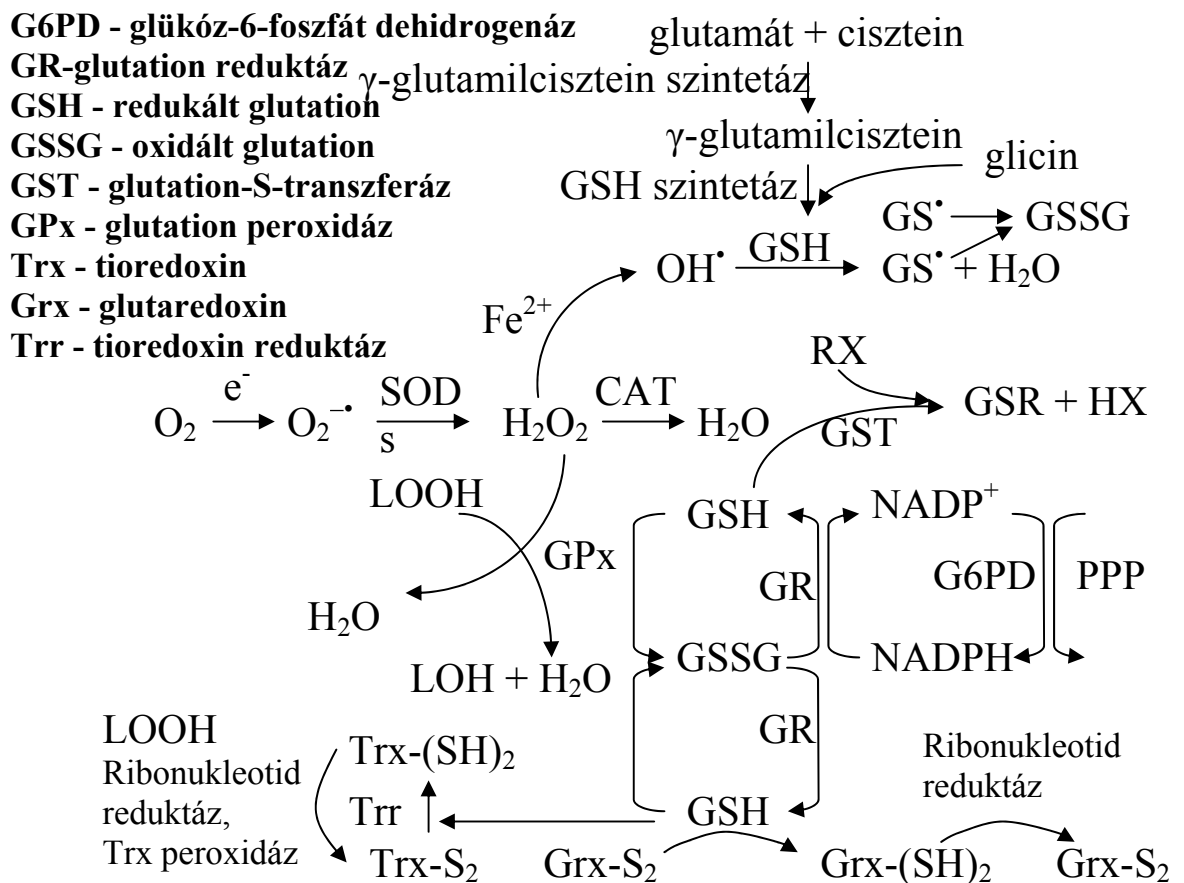
A glutation oxidált formája a glutation diszulfid (GSSG). A glutation peroxidáz enzim végzi a GSH oxidálását, miközben a ROS-ból egy nem reaktív molekula keletkezik. A keletkezett GS^\bullet gyökök egymáshoz kapcsolódva hozzák létre a GSSG-t.





8. ábra. A glutation redukált és oxidált formája.

A GSSG-t a glutation reduktáz alakítja vissza GSH formává NADPH segítségével (8. ábra). A pentóz foszfát ciklusban (PPP) a G6PD enzim mellett a transzketoláz és a ribulóz 5-foszfát epimeráz enzimeknek van jelentős szerepe a NADPH termelésben. A glutation anyagcserében még nagyon fontos enzim a glutation S-transzferáz, amely a glutationt nehézfémekhez, xenobiotikumokhoz, egyéb mérgekhez (növényvédőszer) kapcsolja, így egy glutation S-konjugátum keletkezik, így a toxikus anyag nem tudja kifejteni mérgező hatását. Élesztőkben az *ycf1* fehérje segítségével jutnak be az így keletkezett konjugátumok egy vakuólumba, pl két GSH molekula kapcsolódik egy kadmiumhoz és így transzportálódik (Gomes és mtsai., 2002). Az emlősökben ez a konjugátum az epében távozhat a szervezetből. A *Saccharomyces cerevisiae*ben ennek többféle útja lehet. Ezek mind ATP-igényes transzportok (multispecifikus szerves anion transzporterek, széles specificitású anion transzporterek, ATP-függő GSX transzporterek). A konjugátum a szintézis után rögtön kikerülhet a sejtől, másrészt membránnal körülvéve szállítható, ami kiürítheti tartalmát az extracelluláris térbe, vagy pedig egy vakuólumba. A vakuólumban további enzimátikus folyamatok mennek végbe, amelyek során enzimek segítségével merkapturik sav keletkezik valamint glicin és glutamát (Shi és Dalal, 1990a; Penninckx és Elskens, 1993; Zadzinski és mtsi., 1996; Gullner és Kőmíves, 1998; Emri és mtsi., 1999; Pócsi és mtsi., 2004;).



9. ábra A ROS enzimatis lebonatása, a glutation oxido-redukciós rendszer.

2.5. Kutatási előzmények

Tanszékünkön a kutatási program 1994-ben kezdődött. A *S. pombe* auxotróf ellentétes párosodási típusba tartozó (h^+ , h^-) törzseiből indukált mutagenézissel (UV, nitrozoguanidin) több száz mutánst állítottak elő, melyből biológiai tesztek alapján 11 került kiválasztásra. A 11 mutánsból kettőt, egy szenzitívet, a *chr-51S*-t és egy toleránst, a *chr1-66T*-t, valamint ezek szülői törzsét *6chr*⁺ választottuk ki a további munkákra, melyeket korábban CS-6.51, CT-6.66, illetve CW-6 kóddal publikáltunk (Czakó és mtsi., 1999). Ezek a törzsek haploidok, bizonyítottuk, hogy stabilak mind az auxotrófiára, mind a megváltozott krómérzékenységre nézve és megtartották eredeti párosodási típusukat. A krómmal szembeni érzékenységüket az Anyagok és módszerek részben a 4.1.-es alfejezetben tüntettük fel.

A hatásmechanizmus vizsgálatánál korábban Belágyi és munkatársai (1999) kimutatták a Cr(VI) fluidizáló hatását a plazmamembránra. Bizonyították, hogy az elsődleges támadáspontja a plazmamembrán, de feltételeztük, hogy nem ez az oka a sejtpusztulásnak és

nem ez az oka a megfigyelt fenotípus megnyilvánulásnak, a szenzitivitásnak és a toleranciának.

Kívánatos külön tárgyalnunk a kiválasztott szenzitív és toleráns törzsek biofizikai és biokémiai jellemzését, annak ellenére, hogy a módszerek egy jelentős része átfedő. Tennünk kell ezt azért, mert a klasszikus genetikai vizsgálatok alapján valószínűsíthető, de nem bizonyítható, hogy az indukált mutagénkezelés több mint egy gén mutációját eredményezte a szenzitív fenotípusnál. Ezzel szemben a toleráns mutánsnál bizonyították, hogy a mutáció egy gént érintett, így a fenotípus értelmezése egyszerűbbé válik (Czakó és mtsai., 2004).

Szakmai munkámmal párhuzamosan bizonyították (Czakó és mtsi., 2004), hogy a toleráns törzsnél, a *chr1-66T*-nél a mutáció egy génben történt, amelyet a *chr* utáni egyes szám jelöl, ezt követően a kötőjel utáni 66 a mutáns allélra utal, illetve ezután lévő T a toleráns fenotípust jelöli. A szenzitív mutáns esetében a teljes tetrádok hiánya miatt, a mutagénkezelés következtében bekövetkezett mutációk számát nem tudták meghatározni.

3. Célkitűzések

A krómvegyületek hatásmechanizmusának vizsgálatakor az alábbi célkitűzéseink voltak:

1. Megvizsgáljuk az élesztősejtek plazmamembránja és a CrCl_3 kölcsönhatását, a kölcsönhatás típusát. A szülői *C. albicans* törzs, *erg*⁺ és egyik mutánsa, az *erg-2* kiváló lehetőséget biztosított, hogy a Cr(III) ion plazmamembránra gyakorolt hatásánál vizsgáljuk az ismert és eltérő membránösszetétel hatását.
2. Bizonyítsuk a Cr(III)-plazmamembrán kölcsönhatásánál a szaporodás és életképesség gátló hatás plazmamembrán összetételének függését, a sejtpusztulás végső okát.
3. Megvizsgáljuk a Cr(VI) szenzitív fenotípus biofizikai, biokémiai hátterét egy olyan mutánsnál, a *chr-51S*-nél, amelynél a mutagénkezelés több mint egy génben okozott változást.
4. Kimutassuk a Cr(VI) tolerancia molekuláris hátterét, folyamatait egy olyan mutánsnál, a *chr1-66T*-nél, amelynél bizonyított, hogy a mutagénkezelés hatására a mutáció 1 génben történt.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Mikroorganizmusok

A kísérletekben a következő törzseket használtuk:

Törzs neve	Kód	Eredet leírás
1. <i>Candida albicans</i>	33 <i>erg</i> ⁺	Pesti és mtsi. (1982) ATCC 44829
2. <i>Candida albicans</i>	<i>erg-2</i>	1.-ből NTG kezeléssel ATCC 44831
3. <i>Schizosaccharomyces pombe lys1h⁺ lys1-131</i>	6 <i>chr</i> ⁺	Dr. Sipiczky Mátyás DE, TTK, Genetika és Molekuláris Biológia Tanszék
4. <i>Schizosaccharomyces pombe lys1h⁺ lys1-131</i>	<i>chr-51S</i>	3.-ből NTG kezeléssel
5. <i>Schizosaccharomyces pombe lys1h⁺ lys1-131</i>	<i>chr1-66T</i>	3.-ből NTG kezeléssel

4.2. Anyagok

Fluka:	Dihidroetidium	37291
Reanal:	D-glükóz, L-lizin, NaCl, KCl, Tris/HCL, hidrogén peroxid	
Oxoid:	élesztőkivonat, bakteriológiai agar	
	Sigma:	
K ₂ Cr ₂ O ₇	P-2588	
DHR 123	D-1054	
rodamin	R-8004	
MD	M-5750	
Fenil-metil szulfonil fluorid	P-7626	
NADPH	N-1630	
GSSG	G-4376	
GSH	G-4251	
Klór-dinitro-benzén	C-6396	
Glükóz-6-foszfát	G-7879	

Nikotinamid-dinukleotid foszfát	N-0505
Kümén-hidro-peroxid	C-0524
GR	G-3664
DETAPAC (Diethylenetriaminepenta-acetic-acid)	D-1133
Nitro-blue-tetrazolium (NBT)	N-6876
Xantin	X-2502
Xantin oxidáz	X-4875
5-szulfoszlicilsav	S-2130
4-vinilpiridin	V-3877
DTNB (5,5-ditio-bisz(2-nitrobenzoik sav)	D-6749
2-propanol (izopropanol)	405-7

Szentesi preparátum: csigaenzim

Spektrum-3D: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2EDTA , MgCl_2 , EDTA(Selecton B2), trietanolamin, HEPES

4.3. Táptalajok

A táptalajok a tápoldattal szemben 2% agart is tartalmaznak.

C. albicans komplett tápoldat (YPD):

- 1 % glükóz
- 0.5 % élesztőkivonat
- 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ adenin
- pH: 4,5

Minimál tápoldat (MM):

- 1 % glükóz
- 0.5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0.1 % KH_2PO_4
- 0.05 % $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ adenin
- 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ biotin
- 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tiamin
- pH: 4,5

***S. pombe* komplett tápoldat (YEL):**

3 % glükóz
0,5 % élesztőkivonat
100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ lysin

pH: 4,5

táptalaj (YEA) pH: 5,6

4.4. Oldatok

Na - Hepes puffer

	1000 ml
5,5 mM glükóz	1,062 g
10 mM Hepes	1,191 g
150 mM NaCl	4,38 g
1 mM KCl	0,037 g
100 $\mu\text{g/ml}$	0,1 g
pH: 7,4	

A DHR 123 festéket dimetilformamidban oldottuk fel és -20°C -on sötétben tároltuk.

4.5. Módszerek

4.5.1. Mikroorganizmusok fenntartása

A *S. pombe* törzseket YEA, a *C. albicans* törzseket YPD táptalaj felületén ferde tenyészet formájában tartottuk fenn, hetente friss tenyészetet készítettünk. A törzseket -80°C -on két évi, olaj alatt fél évi tárolás után újítottuk fel. A tenyésztést és a kísérleteket 30°C -on végeztük, ahol ettől az értéktől eltértünk, ott a módszer leírásánál tüntettük fel az alkalmazott hőmérsékletet. A tenyészetek rázatása 30°C -on és 200 fordulat/perc fordulatszámra történt.

4.5.2. *S. pombe* törzsek közép logaritmikus fázisban lévő tenyészetének előállítása

Öt napos ferde tenyészetéről két inokulumnyi sejttel beoltottunk 10 ml YEL tápoldatot. 24 óra múlva sejtszámolást végeztünk, majd beoltottunk 100 ml YEL tápoldatot a 24 órás tenyészetrel úgy, hogy a tenyészet induló sejtszáma 10^6 sejt ml^{-1} legyen. A vad törzs és a toleráns mutáns 16 óra, míg a szenzitív mutáns 20 óra múlva érte el a közép log fázist. Minden kísérletnél, ha másként nincs jelezve, közép log fázisú tenyészeteket használtunk, hogy a vizsgált törzsek azonos fiziológiai állapotban legyenek.

4.5.3. Sejtek gyűjtése, mosása

A 100 ml térfogatú egyéjszakás tenyészetet 3000 fordulat/perc (970g) fordulatszámra 5 percig centrifugáltuk, majd kétszer mostuk fiziológiás sóoldatban ugyanazon centrifugálási paraméterek mellett.

4.5.4. CrCl_3 növekedésgátló hatásának vizsgálata (Pesti és mtsi., 2000)

A *C. albicans* közép log fázisú tenyészeit hasonlóan állítottuk elő, mint az *S. pombe* tenyészeteket, kivéve, hogy itt 3 napos ferde tenyészeteket használtunk. A 33 *erg*⁺ és *erg-2* törzsek közép log fázisú tenyészeit centrifugáltuk, mostuk, majd MM folyékony tápoldatban vettük fel a sejteket. A CrCl_3 különböző koncentrációit (0,2 – 100 mM) adtuk a tenyészetekhez, majd 120 órán keresztül rázattuk a mintákat. A kultúra induló sejtszáma 10^6 sejt ml^{-1} volt, a sejtkoncentrációt meghatározott időpontokban hemocitóméterrel határoztuk meg.

4.5.5. Minta preparálása EPR spinjelölő kísérlethez (Pesti és mtsi., 2000)

A közép log fázisú sejteket centrifugáltuk és mostuk kétszer 0,6 M-os KCl oldatban. A protoplasztképzést 2 %-os liofilizált csigaenzimmel (*Helix pomatia*) végeztük 0,6 M KCl stabilizáló oldatban. A spinjelölést a vegetatív sejtek protoplasztnembránján végezzük, ezért van szükség csigaenzimes kezelésre. 2 órás 37 °C-on történő kezeléssel inkubáció után a protoplasztokat háromszor mostuk stabilizáló oldatban és ötszörösére hígítottuk 0,6 M KCl oldatban. A protoplasztok életképességét minden kezelés esetében meghatároztuk (Pesti és Ferenczy 1982). A kontroll minta készítése során 13 μl 5-(4',4-dimethyloxazolidine-*N*-oxyl)

sztearin savat, másnéven 5-doxilsztearin savat (5-SASL) (5 mg ml^{-1} etanolban oldva) adtunk $300 \text{ }\mu\text{l}$ sejtszuszpenzióhoz, majd ezt a keveréket 10 percig enyhén rázattuk szobahőmérsékleten, elősegítve a spin jelölő beépülését a membránba. A protoplaszt szuszpenziót centrifugáltuk (3000 g-n 3 percig) majd a pelletet felszuszpendáltuk $100 \text{ }\mu\text{l}$ $0,6 \text{ M}$ -os KCL oldatban. A szuszpenziót $100 \text{ }\mu\text{l}$ térfogatú kapillárisba töltöttük át, újból centrifugáltuk $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, majd a felülúszót eltávolítottuk. Minden kapilláris 5×10^8 protoplasztot tartalmazott, mindegyik kísérletben. Az oldat pH-ját $4,3$ -ra állítottuk be 1 M NaOH segítségével. Magasabb pH értéket azért nem alkalmazhattunk, mert a CrCl_3 kicsapódik pH $4,6$ fölött. Miután a spinjelölt zsírsav beépült a membránba, hozzáadtuk a protoplaszt szuszpenzióhoz a CrCl_3 oldatot. A CrCl_3 kezelés után a szuszpenziót kétszer mostuk $0,6 \text{ M}$ KCl oldatban 20 percig. Mosás után EPR szignál növekedést nem mértünk. A mérést $0\text{-}40^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten végeztük. A Cr(III)-nak a sejtek életképességére gyakorolt hatását különböző koncentrációjú CrCl_3 -ot tartalmazó YPD táptalajon végeztük. Néhány esetben kicsi és széles Cr(III) jelet figyeltünk meg, ezeket a méréseket kizselektáltuk.

4.5.6. A spin jelölt EPR mérés paraméterei

Az EPR spektrumot ESP 300E spektrométerrel (Bruker, Germany) rögzítettük, amely fel van szerelve ER412VT hőmérséklet szabályozóval. Az 5-SASL által jelölt zsírsav EPR spektrumát $0\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérséklet tartományban vettük fel mind a kontroll, mind a krómmal kezelt minták esetében. A mérés során a szokásos EPR beállításokat alkalmaztuk: mikrohullámú erősítés, 5 vagy 10 mW ; tér moduláció, 100 kHz ; amplitudó, $0,1\text{-}0,2 \text{ mT}$; spektrum szélesség, 10 mT . Négy kísérleti sorozatot készítettünk mindkét törzssel Cr(III) ion jelenlétében és hiányában, a spektrumokat meghatároztuk és átlagoltuk. Az S rendszer paraméter hibája nem volt nagyobb mint $\pm 0,09$ $0\text{-}40^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleti skálán.

4.5.7. 260 nm-en abszorbeálódó anyagok mérése

A kísérlet során 10 ml $10^8/\text{ml}$ sejtszámú szuszpenziót készítettünk, amelyhez hozzáadtuk a 100 mM -os CrCl_3 oldatot, a pH-t $4,4$ értékre állítottuk be. A kezelést 160 órán keresztül végeztük, 24 óránként mintát vettünk. A mintát lecentrifugáltuk, majd a felülúszó abszorbanciáját mértük 260 nm -en. Majd az üledéket 30 percen keresztül d.v.-ben forraltuk, centrifugáltuk majd a felülúszóból újból abszorbanciát mértünk 260 nm -en.

4.5.8. Peroxid koncentráció mérése áramlási citométerrel (Henderson és mtsai., 1993)

A közép log fázisú tenyészeteket centrifugáltuk, kétszer mostuk, majd felvettük őket Na-Hepes pufferben, a sejtkoncentrációt beállítottuk 10^8 sejt ml^{-1} -re.

A mérést glükóz és aminosav mentes Na-Hepes pufferben végeztük. A sejtészoldatunkat 10-szeresére hígítottuk 2 ml Na-Hepes pufferban, majd hozzáadtunk 4 μl 5 mM-os DHR 123 oldatot, melynek a végkoncentrációja így 10 μM lett. Ezután öt percenként mértük a mintákat egy órán keresztül Becton Dickinson áramlási citométerrel, közvetlenül a mérés előtt a mintát Na-Hepes pufferban hússzorosára hígítottuk (950 μl puffer + 50 μl minta). Az extinció hullámhossz $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, az emissziós $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm volt. A műszer 10 000 sejtet mért le és abból számolt egy átlagot és szórást (FACS Calibur).

4.5.9. Peroxid koncentráció mérése Perkin-Elmer LS50B fluoriméterrel (Henderson és mtsai., 1993)

A mintákat pontosan az előző módszernek (lásd 4.5.8. fejezet) megfelelően készítjük el. Kivéve a sejtkoncentrációt, amelyet a mérés során a küvettában 5×10^6 sejt ml^{-1} -re állítunk be. A gerjesztési hullámhossz $\lambda_{\text{ex}} = 500$ nm, az emissziós $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm volt. A DHR koncentrációja itt is 10 μM . A résszélességet mindkét hullámhossznál 4-es értékre állítottuk be. A mérést két órán keresztül végeztük. A mérések végeztével felvettük a DHR 123 spontán oxidációját is sejtmentes oldatban, melyet kivontunk a törzsek által adott eredményekből.

4.5.10. Sejtpusztítás vizsgálata (Lee és mtsi., 1995)

A pusztítási görbe felvétele során centrifugáltuk, mostuk, majd Na-Hepes pufferban vettük fel a sejteket. Sejtszámolást végeztünk, majd egy 100 ml-es Erlenmayer lombikban 20 ml Na-Hepes puffert 10^6 sejt ml^{-1} sejtsűrűsége állítottuk be. Ezután hozzáadtuk a stresszort megfelelő koncentrációban. A kezelést egy órán keresztül végeztük, vízfürdős rázógépen rázattuk a mintákat, 20 percenként mintát vettünk. A mintát 100-szorosára hígítottuk Na-Hepes pufferban, majd 3-3 Petri csészébe szélesztettünk 50-50 μl -t. Az értékelést öt nap múlva végeztük, a 0 perces sejtszámot vettük 100 %-nak, a 20, 40 és 60 perces minták élő sejtszámát ehhez viszonyítottuk. A pusztítási görbe alapján választottuk ki azt a szubletális koncentrációt, amelynél a tenyészet élő sejtszáma egy órás kezelés után 80-90% között volt. Az adaptációs kísérleteknél ezzel a koncentrációval dolgoztunk tovább.

4.5.11. Adaptációs kísérletek (Lee és mtsi., 1995)

Az adaptációs kísérlet során a már kiválasztott szubletális koncentrációval, tápoldatban kezeltük először a közép log fázisban lévő tenyészeteket. A mintát kettéválasztottuk, centrifugáltuk, mostuk, majd ugyanannyi tápoldatban vettük fel a sejteket. Hozzáadtuk a hatóanyagot, egy órán keresztül kezeltük a tenyészetet. Ezután centrifugáltuk a mintákat, mostuk, majd Na-Hepes pufferban vettük fel a sejteket. Beállítottuk a sejtszámot 10^6 sejt ml^{-1} -re, hozzáadtuk a reagenst különböző koncentrációkban és vízfürdős rázógépen rázattuk a mintákat. Ebben az esetben is 20 percenként vettünk mintát, amelyet 100-szorosára hígítottuk Na-HEPES pufferban, majd 3-3 Petri csészébe szélesztettünk 50-50 μl -t. Öt nap múlva végeztük a kiértékelést, a 0 perces sejtszámot vettük 100 %-nak, a 20, 40 és 60 perces minták élő sejtszámát ehhez viszonyítottuk.

4.5.12. Minta előkészítése enzimaktivitás méréshez

A közép log fázisú tenyészetet lecentrifugáltuk, kétszer mostuk foszfát pufferben (1000 ml d.v.-ben 5 g KH_2PO_4 + 10 g K_2HPO_4 oldunk fel), majd a mintákat felvettük 8 ml foszfát pufferben és 25 ml-es üvegbe raktuk, melynek a belső átmérője kb. 15 mm, majd rögtön beraktuk -20°C -ra. Leghamarabb 4-5 órán belül kezdtük el a sejtfeltárást. Sejtfeltáráshoz X-press-t használtunk (X-PRESS 25 ml, AB BIOX, Dybecksgatan 10, S-412 70 Göteborg SWEDEN), melyet használat előtt 24 órával betettünk -20°C -ra. Két feltárás között legalább két órát hűtöttük a készüléket -20°C -on. Miután behelyeztük a mintát az X-press-be, még húsz percig a fagyasztóban hagytuk. Feltárás után a mintát még napokig, legfeljebb egy hétig tároltuk -20°C -on.

A mérés napján felengedtük szobahőmérsékleten a mintákat, nem siettettük az olvadást, viszont gyakran megkevertük. Centrifugacsövekbe 100 μl Fenil-metil szulfonil fluorid (PMFS) oldatot mérünk (5 mg PMSF-t feloldottunk 500 μl izopropanolban). Ha felolvadt a minta, rögtön 2,9 ml-t belemértünk a PMSF-t tartalmazó centrifugacsövekbe, majd vortexeltük. Ezután már végig jégen tartottuk a mintákat. Hűtött centrifugában 10 000 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntöttük és a továbbiakban használtuk az enzimaktivitások mérésére.

4.5.13. Glutation-reduktáz mérése (Pinto és mtsi., 1984)

A méréshez 0,1 M-os foszfát puffert pH 7,6 használtunk (100 ml d.v.-ben 1,6 g K_2HPO_4 + 0,08 g KH_2PO_4 oldottunk fel), szobahőmérsékleten tároltuk maximum 1 hónapig.

A mérés előtt frissen készítettük az alábbi oldatokat:

- 1 mM NADPH (5 ml pufferben 4 mg NADPH-t oldottunk) mérés során jeges vízben tároltuk,
- 10 mM GSSG (5 ml pufferben 31 mg GSSG-t oldottunk) szobahőmérsékleten oldottuk fel (később ezt is jeges vízben tartottuk).

A mérés során a következő összetevőket mértük össze a következő sorrendben:

100 μ l NADPH, 650 μ l puffer, 150 μ l GSSG, 100 μ l minta.

340 nm-en fotometráltunk 1 percig, vakot nem használtunk, 2-4 párhuzamos mérést végeztünk egy mintából. A méréseket átlagoltuk és ebből számoltuk ki az enzimaktivitást.

$$\Delta A = \Delta C * d * \epsilon_x$$

Ahol: ΔA : a mérés során az abszorbanciaváltozás

ΔC : ezt az értéket keressük, a szubsztrát fogyásának mennyiségét kapjuk meg

d: a kuvetta átmérője (1 cm)

ϵ_x : állandó

(pl.: $\epsilon_{NADPH, 340 \text{ nm}}$: $6,3 * 10^6 \text{ cm}^3 (\text{mol cm})^{-1}$)

A képlet alapján pl.: $\Delta C = \frac{\Delta A}{d * \epsilon_x} = \frac{0,095 \text{ l min}^{-1}}{1 \text{ cm} * 6,3 * 10^6 \text{ cm}^3 (\text{mol cm})^{-1}} = 15 \text{ nmol} (\text{min cm}^3)$

Ezután a mérés során a kuvettában lévő fehérje mennyiségéből kaptuk meg a specifikus enzimaktivitást (megmértük a minta fehérjetartalmát és elosztottuk 10-el, mivel a kuvettában 10-szeresére hígítottuk a mintát):

$$\frac{\Delta C}{T \text{ fehérje}} = \frac{15 \text{ nmol} (\text{min cm}^3)}{0,602 \text{ mg ml}^{-1}} = 24,9 \text{ nmol} (\text{min mg protein})^{-1}$$

4.5.14. Kataláz mérése (Roggenkamp és mtsi., 1974)

A méréshez 20 mM-os Hepes puffert pH 7,6 használtunk (szobahőmérsékleten tároltuk maximum 1 hónapig). Frissen készítettük az alábbi oldatot: 10 mólos eredeti H_2O_2 oldatot 100-szorosára hígítottuk d.v.-ben (mérés során hűtöttük).

A mérés során a következő összetevőket mértük össze az alábbi sorrendben:

100 µl H₂O₂, 880 µl puffer, 20 µl enzimkivonat.

240 nm-en fotometráltunk 1 percig, 1 mintából 3-4 párhuzamos mérést végeztünk kvarcküvetében. Ezeket átlagoltuk és az átlagból számoltuk ki a kataláz aktivitást.

Vakot mértünk a következő módszer alapján: pár másodpercre felforraltunk egy kis mintát egy kémcsőben, majd ebből mértünk aktivitást. Így nem kaptunk peroxid fogyást, ha mégis mértünk volna, akkor azt valószínűleg valamilyen átmeneti fémnek kellett volna okoznia.

A méréseket átlagoltuk és ebből számoltuk ki az enzimaktivitást a következő módon.

Az enzimaktivitás számolás megegyezik a glutation-reduktáz számolásával, kivéve, hogy itt a H₂O₂ állandóját kell vennünk ($\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2, 240 \text{ nm}}: 4,36 * 10^4 \text{ cm}^3 (\text{mol cm})^{-1}$).

4.5.15. Glutation-S-transzferáz mérése (Warholm és mtsi., 1985)

A méréshez 0,1 M-os foszfát puffert használtunk pH 6,5 amely 1 mM EDTA-t tartalmazott (250 ml d.v.-ben 2,72 g KH₂PO₄-t és 93 mg NA₂EDTA*2H₂O-t oldottunk fel). Szobahőmérsékleten tároltuk maximum 1 hónapon keresztül.

A mérés előtt frissen készítjük az alábbi oldatokat:

- GSH oldat (1,5 ml d.v.-ben 9 mg GSH-t oldottunk fel), jeges vízben tároljuk,
- CDNB oldat (1,5 ml etanolban 10 mg CDNB-t oldottunk fel).

A mérés során a következő összetevőket mérjük össze a következő sorrendben:

50 µl CDNB, 850 µl puffer, 50 µl minta, 50 µl GSH.

340 nm-en mérünk 1 percig, egyszerre 2 mintát mértünk, vak (minta mínusz) kellett.

3-4 párhuzamos mérést készítettünk egy mintából, ezek átlagából számítottuk ki az enzimaktivitást.

Az enzimaktivitás számolás megegyezik a GR számolásával, itt viszont a GS-DNB komplex elnyelést mértük ($\epsilon_{\text{GS-DNB}, 340 \text{ nm}}: 9,6 * 10^6 \text{ cm}^3 (\text{mol cm})^{-1}$).

4.5.16. Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz mérése (Emri és mtsi., 1994)

A méréshez 20 mM-os HEPES puffert pH 7,6 (250 ml d.v.-ben 1,1915 g Hepes-t oldottunk fel), valamint 200 mM MgCl₂ oldatot készítettünk (25 ml d.v.-ben 1.555 g MgCl₂*6 H₂O).

Ezt a két oldatot több hétig is tároltuk szobahőmérsékleten.

A mérés napján frissen készítettük az alábbi oldatot:

A oldat: Hepes pufferban feloldottunk 3,15 mg G6P-ot, 7,5 mg NADP-t, hozzáadtunk 2,25 ml $MgCl_2$ oldatot és feltöltöttük 15 ml-re. Ezt az oldatot nem kell jeges vízben tárolni, mivel a reakció ebben történik és a nulla fokos közeg miatt alacsonyabb enzimaktivitást mérnénk. A jeges vízben történő tárolás másik következménye, hogy a küvetta bepárásodik és ezért nem lesz jó a mérés.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze a következő sorrendben, majd intenzíven összeráztuk az oldatot:

900 μ l A oldat, 75 μ l puffer, 25 μ l minta (feltárt sejtek).

A mérést 340 nm-en végeztük, 1 percig. Egyszerre 4 mintát lehet mérni, 2-4 párhuzamos mérést végeztünk egy mintán, ezt átlagoltuk és kiszámoltuk az enzimaktivitást. Vakot nem szükséges készíteni.

Az enzimaktivitás számolás megegyezik a glutation-reduktáz számolásával.

4.5.17. Glutation peroxidáz mérése (Chiu és mtsi., 1976)

A méréshez készítettünk 50 mM-os Tris/HCL pH 7,6 0,091 mM EDTA-át tartalmazó puffert (250 ml d.v.-ben 1,51 g Trist és 85 mg EDTA-t oldottunk fel), szobahőmérsékleten tároltuk.

A mérés előtt közvetlenül a következő oldatokat frissen készítettük:

- 1 mM NADPH oldat (5 ml pufferben 4 mg NADPH-t oldottunk fel)
- 1 mM GSH oldat (10 ml d.v.-ben 3 mg GSH-t oldottunk fel)
- kűmén-hidroperoxid oldat (CHP) oldat (3,3 ml pufferbe 6 μ l eredeti CHP oldatot mérünk)
- GR oldat (20 μ l enzim szuszpenzió + 180 μ l d.v.).

A mérés során a következő összetevőket mértük össze a következő sorrendben:

120 μ l NADPH, 400 μ l puffer, 20 μ l GR, 250 μ l GSH, 200 μ l minta, 20 μ l CHP.

A mérést 340 nm-en végeztük, 1 percig, egyszerre 2 mintát mértünk, vakot (enzim mínusz) is, 3-4 párhuzamos mérést végeztünk egy mintából.

CHP oldatot parafilmrel fedtük le mivel, erős mérég, és mielőtt kimértünk belőle vortexeltük.

GR-t mindig szuszpendáltuk a küvettába való beméréskor.

Jeges vízben tartottuk a NADPH, GR, GSH és a CHP oldatokat.

Az enzimaktivitás számolás megegyezik a glutation-reduktáz enzimaktivitás számolásával.

4.5.18. Szuperoxid-dizmutáz mérése (Oberlay és Spitz., 1984)

A méréshez az alábbi puffert készítettük: 100 ml steril d.v.-ben 53,3 DETAPAC-t, 0,82 g K_2HPO_4 -ot és 44 mg KH_2PO_4 -ot mértünk össze (pH 7,8), 4°C-on tároltuk.

Frissen készítettük az alábbi oldatokat:

- **a.** oldat: 5 ml pufferben 9,2 mg NBT-t oldottunk fel (jeges vízben tároltuk, alufóliával köbetekertük az üveget, hogy sötétben legyen)
- **b.** oldat: 10 ml pufferben 3,3 mg Xantint oldottunk fel (szobahőmérsékleten oldottuk fel, mivel nehezen oldódik, majd utána hűtöttük).

Majd ezután összeállítottuk a következő két oldatot:

A oldat: 18,9 ml puffer + 0,8 ml **a.** oldat (NBT) + 5,4 ml **b.** oldat (Xantin) + kataláz 1-2 mg (alufóliával takartuk be az egész oldatot),

B oldat: 2,5 ml pufferben legkevesebb 125 μ l (250 μ l) Xantin oxidázt oldottunk (jeges vízben tartottuk).

A mérés során a következő összetevőket mértük össze a következő sorrendben:

800 μ l A oldat, 100 μ l minta, 50 μ l B oldat.

A mérést 560 nm-en végeztük 1 percig, 30 másodperces késleltetéssel indítva. Egyszerre 3-4 mintát mértünk, 3 párhuzamos mérést végeztünk mintánként.

Először lemértünk négy vakot (minta helyett puffert raktunk a küvettába), majd minden minta mérésénél párhuzamosan mértünk egy Xantin oxidáz nélküli mintát, amit kivontunk a teljes mérésből.

Számolásnál a minta nélküli vakot is kivontuk a teljes mérésből.

Ellenőriztük a mérés végén, hogy 290 nm-en van-e változás.

A számolást a következők szerint végeztük:

alap esetben: $1 \text{ egység} = (\text{vak átlaga}/\text{minták átlaga}) - 1.$

Pontosabban: $1 \text{ egység} = 50\text{-os maximális inhibíció}$ (különböző mennyiségű mintát adunk a reakcióelegyhez és meghatározzuk a maximális inhibíció feléhez tartozó mintamennyiséget. Ennek aktivitása lesz egy egység). A vak értéke általában 0,015-25 között volt.

Mn-SOD mérésénél az **A** oldathoz 5 mg NaCN-ot adtunk és a minta hozzáadása után 30 percet inkubáltuk az elegyet, majd csak ezután adtuk hozzá a **B** oldatot.

4.5.19. Glutation (GSH) koncentráció mérése (Anderson, 1995)

100 ml mintát centrifugáltuk, mostuk és 4 ml 4°C-os, 5%-os szulfoszalicilsav oldatban vettük fel egy centrifugacsőben, erősen vortexeltük. Inkubáltuk 20 percig 4°C-on. 10 percig centrifugáltuk 10000 fordulatszámon 4°C-on 10 percen keresztül, majd a felülúszóval dolgoztunk tovább. A mérés teljesen megegyezik az alábbiakban leírt GSSG mérésével (4.5.19.1. fejezet), de nem kell a 4-vinilpiridines kezelés, csak a trietanolaminos közömbösítés. Az így kapott jel az össz GSH, amiből le kell vonni a GSSG-t.

4.5.19.1. Oxidált glutation (GSSG) mérése (Anderson, 1995)

A minta készítése megegyezik az előbbieken leírt GSH méréssel, viszont a GSH-t el kellett reagáltatnunk, amit a következőképpen végeztünk:

600 µl mintát (illetve a vaknál a szulfoszalicilsavat) eppendorfba raktunk, adtunk hozzá 12 µl 4-vinilpiridint, 25 µl trietanolamint (viszkózus!). A pH-nak 6 és 7 között kellett lennie (ha túl lúgos volt, akkor adtunk hozzá a mintából, ha pedig savas, akkor trietanolamint adtunk hozzá). 1 órán keresztül inkubáltuk 4°C-on.

A méréshez a következő puffert használtuk:

100 ml d.v.-ben 1,973 g NaH₂PO₄-tot és 2,232 g Na₂EDTA-t feloldottunk, pH 7,5, szobahőmérsékleten tároltuk.

Frissen készítettük az alábbi oldatokat:

a. oldat: 0,248 mg NADPH-t oldottunk 1 ml **A** oldatban (pl.: 22 ml **A** oldat +5,5 mg NADPH kb. 3 mintánál),

b. oldat: 10 mg DTNB-t 5 ml **A** oldatban oldottunk,

c. oldat: 60 µl GR-t 540 µl d.v-ben oldottunk.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze a következő sorrendben:

10 µl minta + 90 µl puffer (**GSH-nál**), 100 µl minta (**GSSG-nél**)

800 µl **a** oldat

100 µl **b** oldat

20 µl **c** oldat (a kűvetta belső, felső falára cseppentve, hogy csak az összerázás hatására induljon el a reakció)

Összerázás után 1 percig mértünk 412 nm-en, egyszerre két mintát mértünk, 3 párhuzamost készítettünk egy mintából.

4.5.19.2. Kalibrálás

Először kalibráló oldatot (kal. oldat) készítünk: 36 ml 5%-os szulfoszalicilsavhoz adtunk 2,2 ml trietanolamint.

GSH kalibráció: 4,6 mg GSH-hoz adtunk 7,5 ml kal. oldatot (GSH koncentráció: 2000 μM)

↓ 10 x-es hígítás

100 μl 2000 μM -os GSH oldat + 900 μl kal. oldat (200 μM)

↓

Ezután a 200 μM –os GSH oldatból készítjük el az alábbi koncentrációkat:

0 μM -os oldat (500 μl kal. oldat)

50 μM -os oldat (125 μl GSH oldat + 375 μl kal. oldat)

100 μM -os oldat (250 μl GSH oldat + 250 μl kal. oldat).

Mérésnél 100 μl -t mértünk be belőlük a küvettába, az 50 μM -osból készítettünk egy 50 μl -es mérést is (25 μM volt a GSH koncentrációja a küvettában), a 100 μM -osból mértünk egy 75 μl -eset is (75 μM volt a GSH koncentrációja a küvettában).

GSSG kalibráció: 4,6 mg GSSG-hez adtunk 7,5 ml kal. oldatot (a GSSG koncentrációja: 1000 μM)

↓10 x-es hígítás

100 μl + 900 μl kal. oldat (100 μM)

↓

Ezután a 100 μM –os GSSG oldatból készítjük el az alábbi koncentrációjú GSSG oldatokat:

0 μM -os oldat (500 μl kal. oldat),

12,5 μM -os oldat (62,5 μl GSSG + 437,5 μl kal. oldat),

25 μM -os oldat (125 μl GSSG + 375 μl kal. oldat).

Mérésnél 100 μl -t mérünk be belőlük, az 12,5 μM -osból készítettünk egy 50 μl -es mérést is (6,25 μM volt a GSSG koncentrációja a küvettában), a 25 μM -osból mértünk egy 75 μl -eset is (így volt 18,75 μM a GSSG koncentrációja a küvettában).

4.5.20. Fehérjetartalom mérése (Peterson, 1983)

A méréshez előzőleg hőlégben sterilizett tiszta kémcsöveket használtunk!

Törzsoldatok:

- **CTC** oldat (0,1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2 % Na/K tartarát, 10 % Na_2CO_3), 4°C-on tároltuk 2-3 hónapig (1 liter d.v.-ben 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -t, 2 g Na/K tartarátot és 100 g Na_2CO_3 -t oldottunk fel),
- **Nátrium-dodecil szulfát (SDS)** oldat (50 ml d.v.-ben 2,5 g SDS-t oldottunk fel) szobahőmérsékleten tároltuk 2 hónapon keresztül,
- **NaOH** oldat (100 ml d.v.-ben 3,2 g NaOH-t oldottunk fel) szobahőmérsékleten tároltuk 2 hónapon keresztül,
- **Folin-Ciocalteu's reagens** (Sigma, 4 fokon tároljuk).

Frissen készítettük az alábbi oldatokat:

- **A reagens** (CTC, SDS és NaOH 1:2:1 arányban mértük össze)
- **B reagens** (Folin-Ciocalteu's reagens és víz 1:5 arányban összemérve).

Mérés:

A mérést úgy célszerű elvégezni, hogy 1 ml d.v.-ben kb. 2-100 μg fehérje legyen, ezért általában 950-990 μl d.v.-hez adtunk 50-10 μl -t a feltárt mintából.

Ehhez az oldathoz 1 ml **A** reagenst adtunk, vortexeltük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Majd 0,5 ml **B** reagenst adtunk az elegyhez, vortexeltük és inkubáltuk szobahőmérsékleten 20 percig (több mintánál az A és a B reagens hozzáadását stopperrel kontrolláljuk, hogy minden mintánál valóban 10 perc legyen az első inkubáció!).

Miután letelt a 20 perc, 750 nm-en fotometráltunk.

3 párhuzamos mérést készítettünk minden mintából, valamint két vakot is (fehérje mínusz).

Kalibrációs oldatot marha szérum albuminból (BSA) készítettünk: 10 ml 0,5 mg ml^{-1} koncentrációjú BSA oldatot készítettünk és úgy hígítottuk, hogy 1 ml d.v.-ben 25, 50, 75, 100, 125 μg fehérje legyen.

Ha valamelyik törzsoldat helyett újat készítettünk, új kalibráló sort is készítettünk.

4.5.21. Szuperoxid gyök koncentráció mérése (Carter és mtsi., 1994)

Gyökfogó festéknek hidroetidint (HE) használtunk. 1 M-os HE törzsoldatot készítettünk etanollal és ezt tároltuk -20°C -on. Ebből etanollal 2 μl -t 2 ml-re hígítottunk a mérés napján (1

mM koncentrációjú lesz az oldat), ebből 200 µl-t 20 ml tenyészetéhez adtunk, majd egy órán keresztül inkubáltuk a tenyésztéskor használt körülmények között.

A tenyészeteket centrifugáltuk, mostuk, majd 1 ml 4°C-os 5%-os szulfoszalicilsav oldatban vettük fel őket. 20 percig inkubáltuk a mintákat jégen, majd 10 percig centrifugáltuk 10 000 fordulatszámon. 500 µl felülúszóhoz 500 µl 0,5 M-os NaOH-t adtunk.

Mérés: Perkin-Elmer LS50B típusú fluoriméteren mértünk, a gerjesztési hullámhossz $\lambda_{ex} = 488$ nm, az emissziós hullámhossz $\lambda_{em} = 610$ nm volt. Kalibrálósort etidium bromidból készítettünk, ügyeltünk arra, hogy a kalibrálósor pH-ja és a minta pH-ja megegyezzen. A kapott értéket fehérjetartalomra vonatkoztattuk.

4.5.22.1. Hidroxil gyök koncentráció mérése tisztított *Saccharomyces cerevisiae* GR enzimmel (Shi és Dalal, 1989)

A méréshez a Sigma által forgalmazott *S. cerevisiae*-ből izolált GR enzimet használtuk.

A mérés során 10 mM-os Hepes puffert használtunk pH 7,6, szobahőmérsékleten tároltuk.

A további oldatokat frissen készítettük:

- Gyökfogónak PBN-t használtunk, amiből készítettünk egy 2 M törzsoldatot (88,6 mg PBN + 125 µl etanol + 125 µl d.v.), amelyet 20 x-ra hígítva használtunk a mérés során.
- Cr(VI) törzsoldat 20 mM-os (58 mg $K_2Cr_2O_7$ + 10 ml d.v.).
- NADPH oldat 20 mM-os (6 mg NADPH + 360 µl d.v.).
- H_2O_2 oldat 30 mM-os (az eredeti törzsoldatot 324 x-re hígítottuk d.v.-ben).
- A GR enzimből 120 egység ml^{-1} törzsoldatot készítettünk d.v.-zel, a különböző csomagolásoknak eltér az aktivitása, ezért minden egyes frissen megkezdett doboznál újra kellett számolni a koncentrációt a fehérjetartalom figyelembevételével.

A mérés során a Cr(VI), NADPH, H_2O_2 , GR oldatokat tízszeresre hígítva használtuk.

Méréskor 100 µl-es kapillárist használtunk, ezért a reakció elegy végtérfogata mindig 100 µl volt, a pufferből raktunk kevesebbet vagy többet, attól függően, hány komponens vett részt a reakcióban. A reagensek hozzáadása után összeráztuk az elegyet és öt perc múlva mértünk.

4.5.22.2. •OH mérése részlegesen tisztított *S. pombe* kromát szenzitív mutáns GR enzimmel (Shi és Dalal, 1989)

A *S. pombe* kromát szenzitív mutánsának *chr1-51S* GR enzimének részleges tisztítását kromatofókuszálással készítette Dr. Pócsi István, Dr. Emri Tamás és Dr. Pusztahelyi Tünde DE, TTK, Mikrobiológia Tanszék). A feltárt mintát dializálták 0.025M Tris-ecetsav pufferben (pH 8.3) és PBE 94 oszlopon kromatofókuszálták (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország). A pH grádienszt Polybuffer 96/Polybuffer 74 keverékével alakították ki (Liu és mtsi. 1997). A mérés során minden komponens megegyezik az előző kísérletben leírtakkal, kivéve, hogy ebben az esetben, mivel az enzim koncentrációja kisebb volt, mint a Sigma eredetű enzim, a részlegesen tisztított GR enzimből 50 µl-t raktunk a kapillárisba.

4.5.22.3. •OH mérése feltárt mintákból (Shi és Dalal, 1989)

Mérés során ugyanazokat a Cr(VI), NADPH, H₂O₂, PBN és Hepes oldatokat használtuk, ugyanolyan koncentrációban, melyekkel a Sigma GR enzim mérésekor dolgoztunk (4.5.22.1.). Közép log fázisú tenyészeteket centrifugáltuk, mostuk, majd elvégeztük a feltárást. A kész mintáknak megmértük az OD értékét 280 nm-en, majd beállítottuk őket egyenlő értékűre (az OD 280 nm-s mérés egy gyors fehérjetartalom mérést szolgáltat). Ezután a mérés során a kapillárisba 50 µl mintát raktunk, a plusz térfogatot Hepes pufferral töltöttük ki.

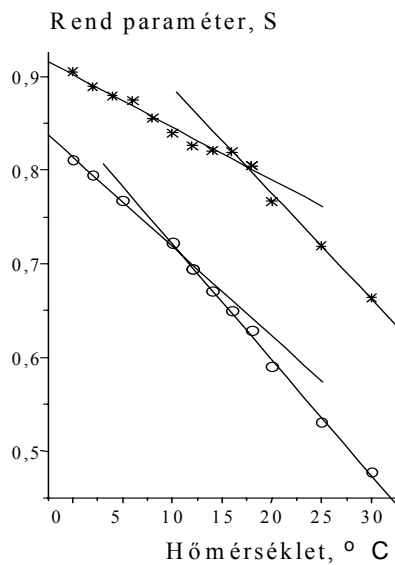
5. Eredmények

5.1. A Cr(III) hatása *C. albicans* élesztő sejtek plazmamembránjára.

A kísérletekhez a bevezetésben részletesen ismertetett (2.1.2. fejezet) plazmamembrán mutánsokat használtuk. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az *erg-2* mutánsban ergoszterin helyett zymoszterin és fekoszterin intermedierek felhalmozódását bizonyították, amely Δ^8 - Δ^7 izomeráz enzim mutációjának tulajdonítható. A sejtek a legfontosabb membránmerevítő molekula, az ergoszterin kiesését túlkompenzálták, oly módon változtatták meg a foszfolipidek és zsírsavak arányát, hogy a végeredmény a mutáns membránjának merevebbé válása lett, amelyek a szerzők *in vitro* kísérletekben lipid extraktumon bizonyítottak (Pesti és mtsi. 1985).

A saját kísérleteinkből is tudjuk, hogy az élesztősejtek CrCl_3 oldatban elpusztulnak. Arra szeretnénk volna választ kapni, hogy mi az oka a sejtek pusztulásának. Ez a kísérleti rendszer lehetővé tette, hogy ne csak a pusztulás okára, hanem arra is válasz kapjunk, hogy a plazmamembrán összetétele milyen hatással van a Cr-plazmamembrán kölcsönhatás rendszerében.

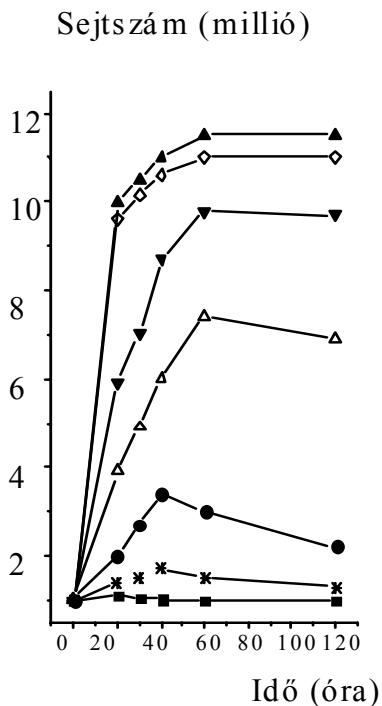
Leellenőriztük az *in vitro* kísérletek során nyert megállapítást, *in vivo* kísérletben protoplasztokat használva megmértük a *33erg*⁺ és az *erg-2* mutánsnál a rend paraméter (S) értékeit. Az eredményt az 10. ábra mutatja. Kísérleteink azt mutatták, hogy az ergoszterin termelő *33erg*⁺ törzshöz képest a fázistranzíciós érték 13°C-ról 17°C-ra nőtt az *erg-2* mutánsban. *In vivo* is bizonyítható a membrán merevségének a változása.



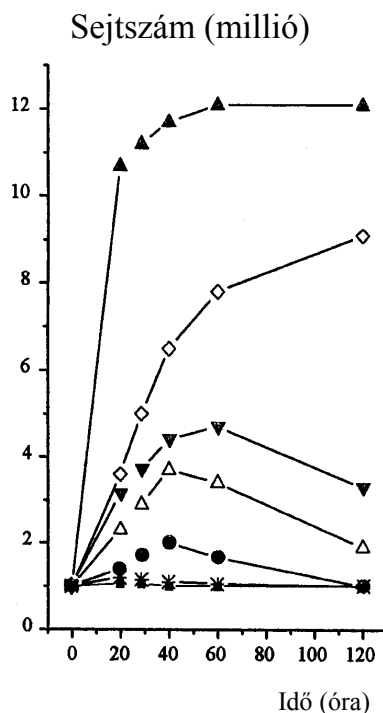
10. ábra A rend paraméter változása a hőmérséklet függvényében. A 33 *erg*⁺ törzs és az *erg-2* mutáns protoplasztjait 5-SASL spinjelölővel jelöltük. Szimbólumok: ○, 33 *erg*⁺ törzs; x, *erg-2* mutáns.

5. 1. 1. A króm(III)-plazmamembrán kölcsönhatás vizsgálata.

Első kísérleteinkben meghatároztuk a 33*erg*⁺ *C. albicans* törzsnél és az ergoszterin hiányos *erg-2* mutánsnál a CrCl₃ különböző koncentrációinak szaporodásra gyakorolt hatását az idő függvényében (11. és 12. ábra).



11. ábra



12. ábra

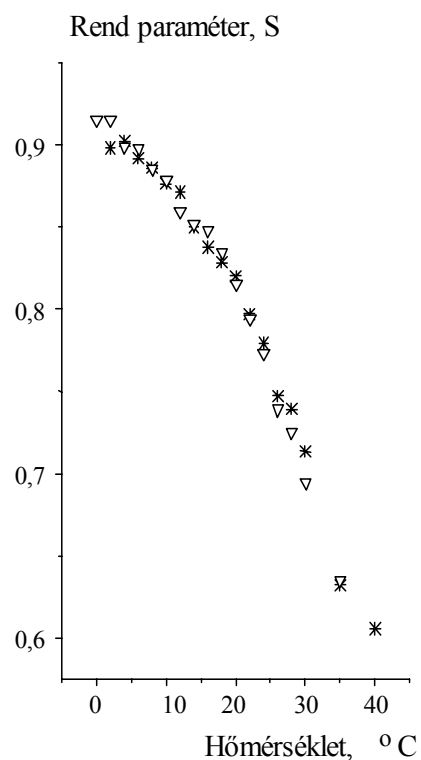
11. ábra A CrCl_3 szaporodásra gyakorolt hatása az ergoszterol termelő 33 erg^+ törzsnél minimál tápoldatban, 30°C -on. Szimbólumok: ▲ kontroll ◇ 0.2 mM CrCl_3 , ▼ 0.8 mM CrCl_3 , △ 3.2 mM CrCl_3 , ● 12 mM CrCl_3 , x 50 mM CrCl_3 , ■ 100 mM CrCl_3 .

12. ábra A CrCl_3 szaporodásra gyakorolt hatása az ergoszterolt nem termelő erg-2 mutánsnál minimál tápoldatban, 30°C -on. Szimbólumok: ▲ kontroll ◇ 0.2 mM CrCl_3 , ▼ 0.8 mM CrCl_3 , △ 3.2 mM CrCl_3 , ● 12 mM CrCl_3 , x 50 mM CrCl_3 , ■ 100 mM CrCl_3 .

Az ábrákon jól látható, hogy az ergoszterin hiányos mutáns jelentősen érzékenyebb minden alkalmazott krómkoncentrációnál a CrCl_3 szaporodásgátló hatására. Mindkét törzsnél 100 mM CrCl_3 megállította a sejtszaporodást, de ezek a sejtek annak ellenére, hogy szaporodásra már nem voltak képesek, éltek, ha a sejtszuspenziót kiszélesztettük a megfelelő komplett táptalajra, az élő sejtszám nem csökkent két óra kezelést követően. Megvizsgáltuk mindkét törzsnél a populáció életképességét és kimutattuk, hogy az életképességük 160 órás CrCl_3 kezelés hatására csökkent nullára.

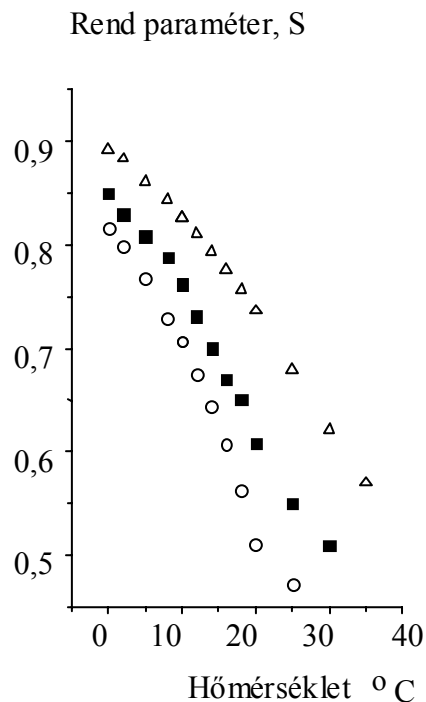
Szerettük volna megtudni, hogy a Cr(III)-plazmamembrán kölcsönhatásnak van-e elektronmikroszkóposan kimutatható jele, de a fagyasztvamaratásos technikát alkalmazva a plazmamembrán finomsztruktúrája megfigyelhető változást nem mutatott. Ezeket a kísérleteket, Prof. Agustin Svoboda laboratóriumában (Masaryk University, Department of Biology, Brno, Cseh Köztársaság) végeztük, az eredményeket nem közöltük.

Megvizsgáltuk az *erg-2* mutánsban, hogy reverzibilis-e a hőmérséklet indukált változás a sejtmembránján. A protoplasztokat spin-jelölt 5-SASL-al jelöltük és megmértük a rend paraméter értékeket 0°C és 40°C között, valamint ezt követően visszafelé 40°C és 0°C közötti tartományban (13. ábra). Mint a kísérleti eredményekből is ez látható, a szélsőséges hőmérsékletváltozás nem befolyásolta a kapott rend paraméter értékeket. Ez lehetővé tette a későbbi kísérletekben, hogy egy adott preparátumon többször egymást követően megmérjük a rend paraméter értékeit.



13. ábra A protoplaszt membrán hőmérséklet indukálta változásainak reverzibilitása. Az *erg-2* törzsből készített protoplaszt mintákat 5-SASL spinjelölővel jelöltük. A spektrumot először egyre növekvő (0°C-tól 40°C-ig (x)), majd egyre csökkenő (40°C-tól 0°C-ig (∇)) hőmérsékleten lett felvéve.

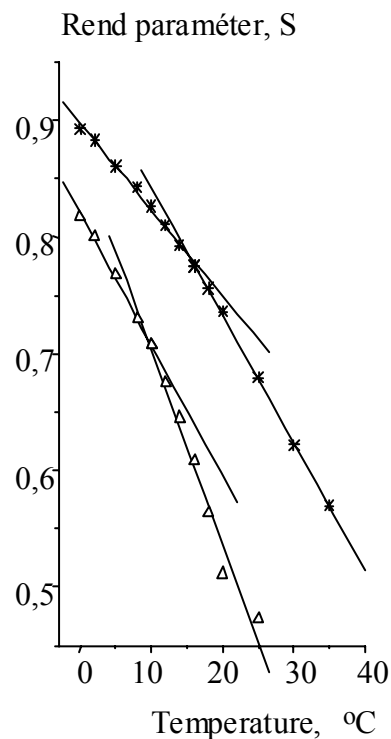
Közismert tény, hogy a pH változás önmagában a membrán fluiditás változását eredményezi. Tekintettel arra, hogy CrCl₃ az alkalmazott 100 mM-os koncentrációban jelentősen módosítja az oldat pH-ját, ezért megmértük a rend paraméter értékeket 0°C-40°C fokos tartományban az *erg-2* mutáns pH 8,02-nél (0,6 M KCl oldatban), valamint pH 4,3-nál és 2,15-nél (100 mM CrCl₃ oldatban) (14. ábra).



14. ábra A pH hatása a spinjelöltek környezetére. Az *erg-2* törzsből készített protoplaszt mintákat 5-SASL spinjelölővel jelöltük. Szimbólumok: Δ, kontroll minta 0.6 M KCl-ban, pH 8.02; ■, 100 mM CrCl₃, pH 4.30; ○, 100 mM CrCl₃, pH 2.15.

Az eredményekből láthatjuk, hogy a pH jelentősen módosíthatja a mérés során kapott eredményeket.

Ezt követően megmértük a Cr(III) plazmamembránra gyakorolt hatását 0-40°C-os tartományban a szülői 33 *erg*⁺ törzsen és az *erg-2* mutánsnál. A Cr(III) kezelés mindkét törzs esetében fluidizálta a membránt, viszont az *erg-2* mutánsnál ez a hatás sokkal erősebb volt. Ez látható a 15. ábrán.



15. ábra A Cr(III) kezelés hatása a spin jelölő mobilitására. Az *erg-2* törzsből készített protoplaszt mintákat 5-SASL spinjelölővel jelöltük. Szimbólumok: x kontroll minta, Δ 120 perces 100 mM Cr(III) kezelés után.

A fenti eredmények egyértelműen alátámasztották azt a sejtésünket, hogy a háromértékű króm kation kölcsönhatásba lép a plazmamembránnal és fluidizálja azt.

Még mindig nem kaptunk választ arra, hogy miért pusztulnak el a sejtek. Feltételeztük, hogy a fluidizáló hatással egyidőben a plazmamembrán koncentráció és idő függvényében fokozatosan elveszti szemipermeabilitását. Ennek megfelelően, meghatároztuk a 260 nm-nél adszorbeáló anyagok kiáramlását a sejtéből 100 mM CrCl₃ koncentrációnál 10 óra kezelés után. Kísérleteink azt mutatták, hogy a 33 *erg*⁺ törzs 40%-át, az *erg-2* mutáns pedig 60%-át veszíti el ezen létfontosságú citoplazmában tárolt metabolitoknak. Ez egyrészt

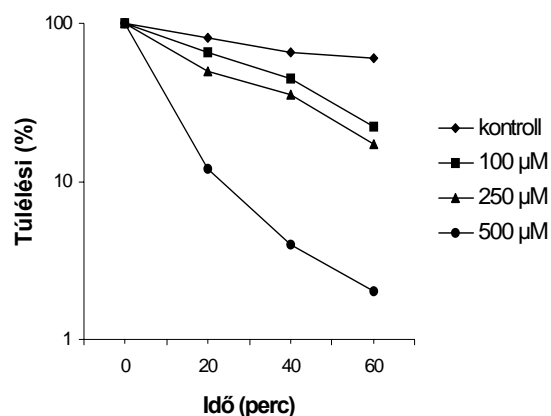
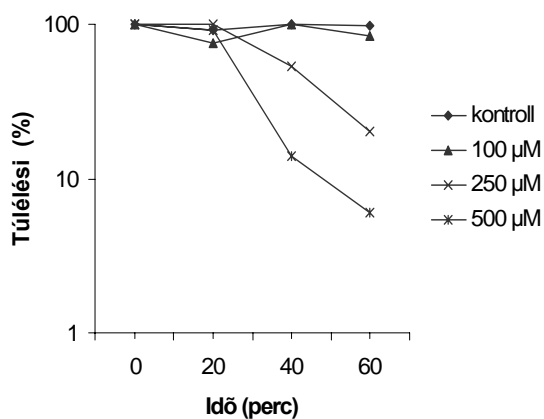
alátámasztotta és megmagyarázta a 12. és 13. ábrán kimutatott különbséget, nevezetesen azt, hogy az *erg-2* mutáns fokozottabban érzékeny a kölcsönhatásra, nagyobb mértékben veszi el a membrán barrier funkcióját, mint a szülői törzsnél.

Kísérleteink egyértelműen bizonyítják, hogy a háromértékű króm kation elsődleges támadáspontja a plazmamembrán és hatását alapvetően befolyásolja a plazmamembrán összetétele. A sejtpusztulás oka a Cr(III) által kiváltott szemipermeabilitást biztosító barrier funkciók módosulása, illetve elvesztése.

5. 2. A Cr(VI) hatása a *S. pombe* hasadó élesztőben.

5. 2. 1. A *S. pombe chr-51S* Cr(VI) szenzitív mutáns jellemzése

A *chr-51S* Cr(VI) szenzitív törzsnek a $K_2Cr_2O_7$ minimális gátló koncentrációja 125 μM , míg a *chr*⁺ szülői törzssé 225 μM volt. A *chr-51S* mutáns sokkal magasabb Cr(VI) bioakkumulációs képességgel rendelkezik, mint a *chr*⁺ szülői törzs (Czakó-Vér és mtsi., 1999). A bevezetőben részletezett módon (lásd 2.4.5. fejezet) az *in-vitro* kísérletek azt valószínűsítették, hogy *in-vivo* körülmények között a felvett Cr(VI) redukciója, illetve Fenton típusú reakciója miatt a sejtet oxidatív stresszhatás éri, amelyet a keletkezett $\cdot OH$ gyök okoz. A *S. pombe*benál Lee és mtsi. (1995) bizonyították, hogy H_2O_2 és MD, mint oxidatív stresszorok, alacsony szubletális koncentrációban olyan celluláris folyamatokat indukálnak, amelyek egy azt követő magasabb koncentrációjú oxidatív stresszorról szemben védelmet nyújtanak a sejtnek, a sejtpopulációnak. Megnéztük, igaz e ez a $K_2Cr_2O_7$ esetében. A 16. ábra szemlélteti a kísérleti eredményeket.



A

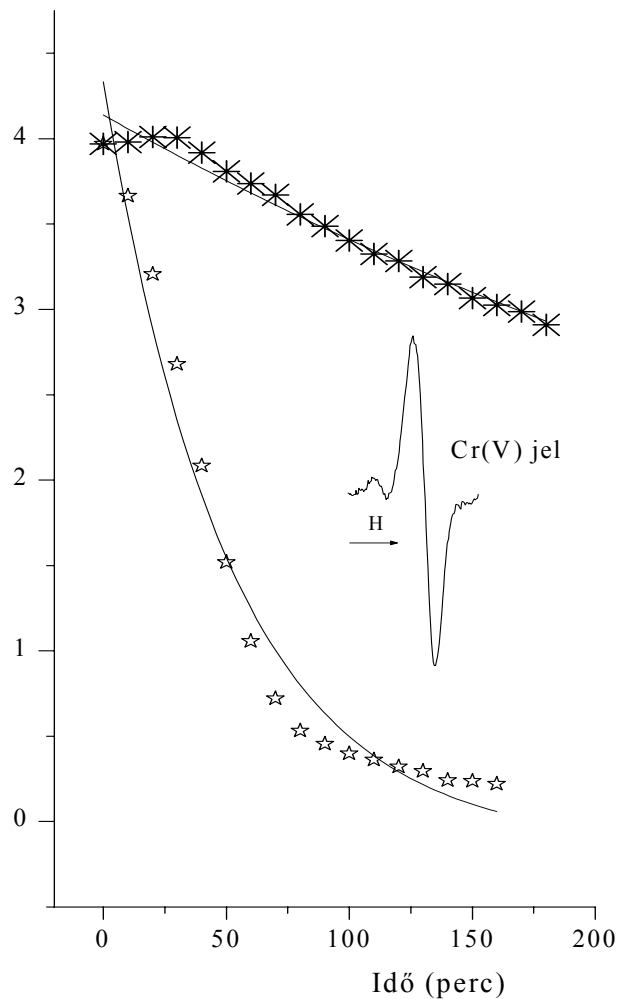
B

16. ábra A *S. pombe* vad δchr^+ törzsének pusztítási görbéje különböző Cr(VI) koncentrációk mellett (A) és adaptációja 50 μ M-os Cr(VI) előkezelés hatására (B) (1 óra, YEL tápoldatban 30°C-on).

Az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy kálium-bikromáttal szemben a sejtek nem rendelkeznek adaptív sejtválással. Ez a kísérleti tapasztalat a további kutatási program igen lényeges megállapítása. Nem számolhatunk a Cr(VI)-ra specifikus jelátviteli rendszerek (szignál-transzdukció) aktiválásával, stb.

A következőkben megvizsgáltuk a redukciós folyamatokat, illetve ezek elemeit. Megvizsgáltuk EPR technikát alkalmazva a Cr(V) redukció időfüggését (17. ábra). Tehettük ezt azért, mert a Cr(V) oxidációs állapotnak az EPR spektrumon jól azonosítható spektruma van, melynek segítségével a kvantitatív viszonyok az idő függvényében követhetőek.

Cr(V) koncentráció



17. ábra A Cr(V) koncentrációjának időfüggése a *S. pombe* 6chr⁺ törzsének (*) és Cr(VI)-szenzitív chr-51S mutánsának (I) 25 °C-on.

A kísérlet egyértelműen mutatja, hogy 2,5-ször nagyobb mennyiségű Cr(V)-öt halmozott fel a chr-51S szenzitív mutáns a mérés kezdetéig ugyanolyan körülmények között, valamint, hogy ezt a Cr(V)-öt jelentősen gyorsabban redukálja, mint ahogy az a szülői 6chr⁺ törzs esetében történik. A kiinduló értékeket egy magasságba vittük a grafikonon, amiatt, hogy a redukció mértéke a két törzs között szembetűnőbb legyen (17. ábra).

Shi és mtsi. (1999) számos *in vitro* kísérlete azt valószínűsítette, hogy az élővilágban, és így az élesztőknél is, a sejt oxidoredukciós állapotában talán legfontosabb szerepet játszó

glutation a felelős a Cr(VI) redukcióért. Megvizsgáltuk a két törzs glutation tartalmát és azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy a szülői törzsben lévő glutation mennyiségének csak közel a felét tartalmazza a Cr(VI) szenzitív mutáns (1. táblázat).

	Szülői törzs <i>6chr</i> ⁺	Cr(VI)-szenzitív mutáns <i>chr-51S</i>
GSH ^b	58 ± 11.0	32 ± 2.8 ^{***}
GSSG ^b	0.34 ± 0.09	0.22 ± 0.10
GSH/GSSG	170 ± 55	145 ± 67
G6PD ^c	119 ± 16	218 ± 28 ^{***}
GR ^c	29 ± 2.4	71 ± 9.3 ^{***}
GST ^c	18 ± 5.0	32 ± 4.3 ^{**}
SOD ^d	3.4 ± 0.82	3.8 ± 0.78
SOD _{Mn} ^d	1.6 ± 0.22	1.7 ± 0.07
SOD _{CuZn} ^d	1.8 ± 0.85	2.1 ± 0.80
Kataláz ^e	20.6 ± 1.7	19.8 ± 3.3
GP _x ^e	3.0 ± 0.95	3.0 ± 0.56
Indukált kataláz ^{e*}	34.1 ± 2.5 ^{***}	27.8 ± 3.1 [*]
ET ^b	0.047 ± 0.007	0.077 ± 0.010 ^{**}

Specifikus értékeket átlag ± S. D. formában fejeztük ki, 4 független kísérlet értékeiből kiszámolva.

^b Specifikus koncentráció nmol (mg protein)⁻¹ adtuk meg

^c Specifikus aktivitást nmol (min. mg protein)⁻¹ adtuk meg

^d Specifikus aktivitást egység (min mg protein)⁻¹ adtuk meg

^e Specifikus aktivitást μmol (min. mg protein)⁻¹ adtuk meg

^{e*} Indukálva 0.2 mM H₂O₂-al 1 órán keresztül

* p < 5%; ** p < 1%; *** p < 0.1%. p értékeket a t-próba segítségével számoltuk ki.

1. táblázat A *S. pombe* szülői törzsének *6chr*⁺ és Cr(VI) szenzitív mutánsának *chr-51S* specifikus GSH, GSSG, és etidium-bromid (ET, a szuperoxid gyök koncentrációjára vonatkoztatunk etidium-bromiddal) koncentrációja és specifikus G6PD, GR, GPx, GST, SODs és kataláz aktivitása.

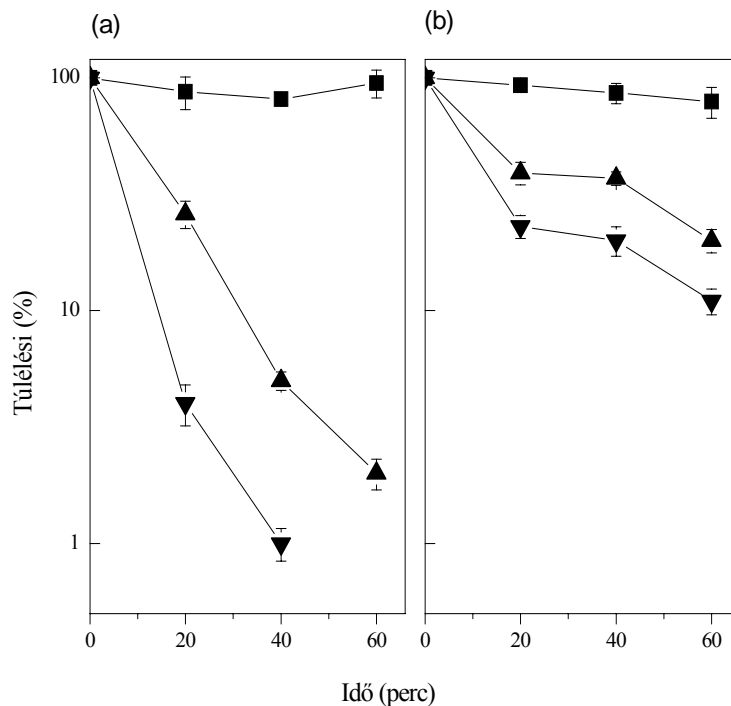
Ugyanakkor a GSH/GSSG arány szignifikáns különbséget nem mutatott, ami azt jelenti, hogy a sejt intracelluláris redox állapota egyensúlyban van. Tekintettel arra, hogy a *S. pombe* nem szintetizál a növényeknél oly fontos, jelentős mennyiségben jelen levő aszkorbinsavat, illetve az állatvilágban jelentősnek mondható E-vitamint, ezért figyelmünk egy másik számításba jöhető, szintén Shi és Dalal (1990c) által közölt, *in vitro* Cr(VI) redukcióra képes GR/NADPH oxido-redukciós rendszerre vetődött. Megmértük a specifikus enzimaktivitását a GR és G6PD enzimeknek. Mind a két enzim esetében kb. kétszeres specifikus enzimaktivitás mértünk a szenzitív mutánsban a szülői törzshöz képest (1. táblázat). A redukcióval kapcsolatos eddigi

eredmények alapján azt valószínűsítjük, hogy a GSH mellett a GR/NADPH redukciós rendszer az, ami a meghatározó szerepet játssza a Cr(VI) \rightarrow Cr(III) redukciós folyamatban.

A CuZnSOD, MnSOD, kataláz és a GPx specifikus enzimaktivitás nem változott a szenzitív mutánsban, viszont a kataláz indukálhatósága peroxidokkal sokkal alacsonyabb a szenzitív mutánsban, mint a szülői törzsben (1. táblázat). Érdekes tény, hogy a GPx specifikus enzimaktivitása nem változott alacsony koncentrációjú H₂O₂ és tBOOH oxidatív stresszorokkal végzett kezelés hatására, és a GR specifikus enzimaktivitására nem volt hatással 0,5 mM-os koncentrációjú diamid kezelés, ami viszont 2,3-szorosára emelte az intracelluláris GSSG koncentrációjának szintjét a sejtekben.

Hogy választ kapjunk erre a kérdésre, megvizsgáltuk a legfontosabb folyamatokat, enzimaktivitásokat, amelyek a Cr(VI)-Cr(III) intermedierek reoxidációját eredményezheti.

Adaptációs előkísérletekben H₂O₂ és MD kezelés hatására megfigyeltük, hogy az előkezelés csökkentette az ezt követő kálium-bikromát kezelés sejtpusztító hatását (18. ábra). Ezen kísérletek eredményeit kielemezve meghatároztuk a szuperoxid gyök és a hidrogén-peroxid koncentrációját közép log fázisú tenyészeteknél (1. táblázat, 19. ábra). A szuperoxid-gyökök koncentrációja szignifikánsan magasabb a szenzitív mutánsban, mint a szülői törzsben, annak ellenére, hogy az össz SOD-ot alkotó MnSOD és ZnCuSOD specifikus aktivitása a két törzsben azonos. A hidrogén-peroxid intracelluláris koncentrációja is szignifikánsan magasabb 1,6-szor a szenzitív mutánsban (19. ábra), amit okozhat a szuperoxid-gyökök magasabb intracelluláris koncentrációja, valamint a kataláz enzim alulszabályozottsága (1. táblázat). Ugyanilyen kinetikai különbséget kaptunk a DHR 123 oxidációjában a két törzs között, ha a peroxidkoncentrációt áramlási citométerrel határoztuk meg. Tekintettel arra, hogy mind a szuperoxid-gyök, mind a H₂O₂ részt vesz a bevezetőben ismertetett (2.4.5. fejezet) Fenton-típusú Haber-Weiss reakcióban, azaz a Cr(VI) intermedierek reoxidációjában \cdot OH gyökképzés közepette, a kísérleti eredmények magyarázzák a *chr-51S* mutáns Cr(VI) szenzitivitását, azaz a jelentősen megnövekedett Cr(VI) érzékenységet és a jelentősen megnövekedett sejtpusztulás a Cr(VI) adás hatására a szülői törzshöz képest.

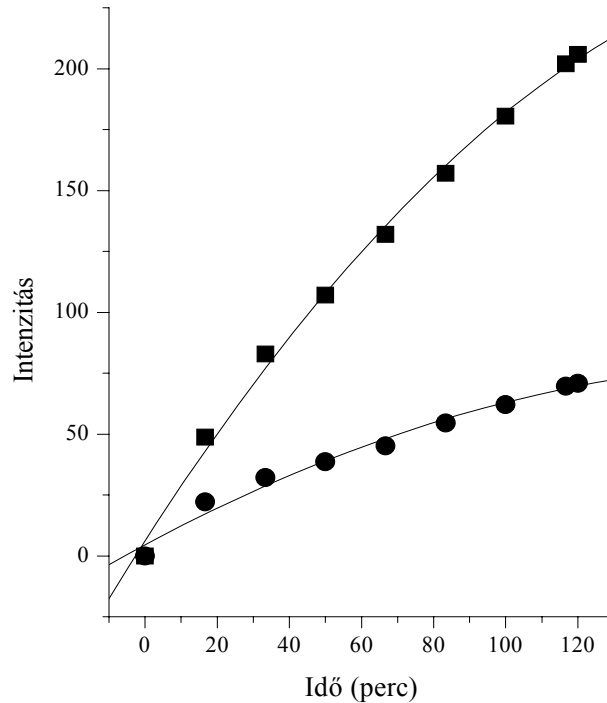


18. ábra *S. pombe* 6chr⁺ törzs közép-log fázisú sejtek YEL tápoldatban 60 percen keresztül nem előkezelt (a) és 0.2 mM H₂O₂-al előkezelt mintái (b). Az előkezelés után kezeltük a mintákat a következő K₂Cr₂O₇ koncentrációkkal: 0 (■), 250 (▲) vagy 500 (▼) μM .

Kezeltük a törzset szubletális dózisú CdCl₂-al (200 μM), amelynek hatására az intracelluláris GSH tartalom 25%-al csökkent mindkét törzsnél. A CdCl₂ előkezelés után kezeltük a szülői törzset 250 μM Cr(VI)-al egy órán keresztül, amelynek során az élő sejtek száma az előkezelt kultúrában alacsonyabb volt, mint a kontroll tenyészetben. Másrészt, hogy a sejtek adaptálódnak tudjanak az oxidatív stresszhez, előkezeltük őket 0,2 mM H₂O₂-al, amelynek hatására szignifikánsan megnőtt a tenyészetek élő sejszáma 250 és 500 μM -os Cr(VI) kezelés után (18. ábra).

Lee és mtsi. mutatták ki, hogy a sejtek 0,2 mM-os H₂O₂-al történő kezelése során adaptálódnak H₂O₂-al szemben, e kezelés során indukálódott kataláz 2,8-szorosára, a GPx pedig 2,0-szeresére nőtt (Lee és mtsi., 1995). Ezen antioxidáns enzimek megnövekedett

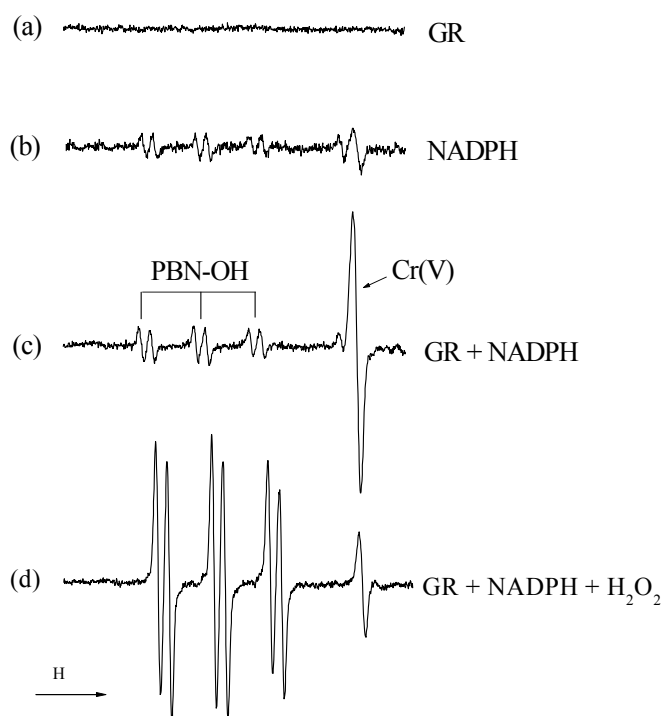
aktivitása miatt lecsökkent az intracelluláris H_2O_2 koncentráció a kezelés ideje alatt, és ezáltal a Cr(VI) kezelés során keletkező $\cdot\text{OH}$ gyökök mennyisége is csökkent.



19. ábra A peroxid koncentrációjának meghatározása a *S. pombe* Cr(VI)-szenzitív *chr-51S* mutánsánál (■) és szülői törzsnél *6chr+* (●). A DHR 123 átalakulását fluoreszkáló rodaminná $5 \cdot 10^6$ sejt ml^{-1} Na^+ pufferban 21°C -on mértük Perkin Elmer fluoriméter segítségével ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ and $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm).

Az 1. táblázatban látható, hogy az antioxidáns enzimek közül sem a kataláz, sem a GPx specifikus aktivitása nem különbözik a vizsgált két törzsnél. Ezzel szemben az indukált kataláz aktivitás alacsonyabb a szenzitív mutánsban, amely arra utal, hogy a szenzitív mutáns védelmi rendszere mind a megnövekedett intracelluláris, mind a külsőleg adott oxidatív stresszel szemben csökkent mértékű, azaz kataláza alulregulált.

Ezen kísérleteinket alátámasztották a vizsgált törzsekből származó *in vitro* kísérleteink. EPR mérésekkel bizonyítottuk, hogy a GR önmagában nem, a NADPH csak kismértékben eredményezi a Cr(VI) redukcióját Cr(V)-é. Ezzel szemben, a GR + NADPH együtt jelentős Cr(V) redukciót indukál, ha ehhez az utóbbi rendszerhez H₂O₂-ot adunk, akkor Cr(V) csökkenésével egyidőben igen jelentős [•]OH gyök termelés következik be (20. ábra).



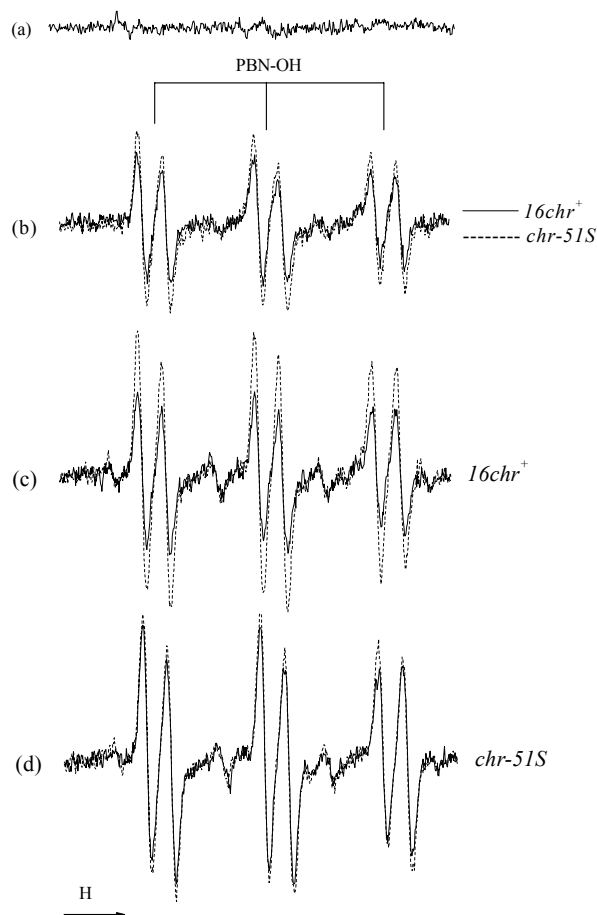
20. ábra A GR *in vitro* Cr(VI) redukáló képességének vizsgálata. Az EPR spektrumot 5 perccel az összekeverés után rögzítettük 2 mM K₂Cr₂O₇-t, 0.1 M PBN-t tartalmazó pufferoldatban (pH = 7.2) (a) 12 U/ml élesztő GR, (b) 2 mM NADPH; (c) 12 U/ml élesztő GR és 2 mM NADPH, (d) 12 U/ml élesztő GR, 2 mM NADPH és 3 mM H₂O₂. A spektrométer beállításai: modulációs amplitudó, 1.6 G; a mérés időtartama, 400 másodperc; mért terület, 3482 ± 50 G. A Cr(V) jel g – faktora 1,9554 volt.

Ezen *in vitro* PBN spin-csapdával készített EPR kísérleteket elvégeztük *S. cerevisiae* és *S. pombe* tisztított GR enzimmel is, amelynek során bizonyítottuk, hogy mindkettő képes redukálni a Cr(VI)-ot Cr(V)-é.

Mindegyik minta tartalmazott 2mM $K_2Cr_2O_7$ -t és 0.1 M PBN-t (20.a-d ábra). A puffer oldat 12 U/ml izolált élesztő GR tartalmazott, amely így nem adott detektálható EPR jelet (20.a ábra). Azonban, ha az oldathoz 2 mM NADPH-t adtunk GR nélkül, akkor már kaptunk egy kis mértékű PBN-OH jelet ($C_{PBN} = 0.31 \mu M \pm 0.07$) és egy kis mértékű Cr(V) szignált ($C_{Cr(V)} = 0.29 \mu M \pm 0.06$) $g = 1.9554$ -nél a korábbi eredmények szerint (20.b ábra) (Shi és Dalal, 1989). Az egyidőben adott GR és NADPH hatására szignifikánsan megnövekedett az oldatban a PBN-OH termékek koncentrációja ($C_{PBN} = 0.83 \mu M \pm 0.14$) és vele párhuzamosan megnőtt a keletkezett Cr(V) koncentráció is ($C_{Cr(V)} = 2.58 \mu M \pm 0.04$) (20.c ábra). Amikor 3 mM H_2O_2 -t adtunk a mintához, akkor az oldatban a PBN-OH termék koncentrációja tovább nőtt, majdnem tízszeresére ($C_{PBN} = 7.62 \mu M \pm 0.03$) viszont a Cr(V) mennyisége lecsökkent ($C_{Cr(V)} = 0.92 \mu M \pm 0.02$) (20.d ábra). Ezen kísérleti eredmények bizonyítják a Cr(VI) egyelektronos redukcióját Cr(V)-é a *S. cerevisiae*-ből és *S. pombe*-ből izolált GR enzim segítségével, valamint a reoxidációját a Cr(V)-nek Cr(VI)-á H_2O_2 jelenlétében a Haber-Weiss reakció során.

Ha kísérleteinket föltárt sejteken végeztük, az eredmények alátámasztották a korábban ismertetett, biofizikai és biokémiai eredményeket (21. ábra).

A két törzs relatív $\cdot OH$ gyöktermelő képességét PBN spinfogóval határoztuk meg. A $\cdot OH$ gyök, valamint a Cr(V) mennyiségét öt perccel a $K_2Cr_2O_7$ adása után határoztuk meg. Amikor a pufferoldatban feltárt minta, $K_2Cr_2O_7$ és PBN volt, akkor a PBN-OH mennyisége $36\% \pm 12\%$ -al magasabb volt a *chr-51S* szenzitív mutánsban, mint a *6 chr⁺* szülői törzsben (21.b ábra). Ezen eredmények alátámasztották a mutáns magasabb króm(VI) redukáló képességét és magasabb intracelluláris H_2O_2 koncentrációját. 2 mM NADPH adása nem okozott számottevő PBN-OH addukt növekedést a szülői törzsben, ugyanakkor a mutáns törzsben a növekedés mértéke szignifikáns, $46 \pm 12\%$ volt (21.c és d ábra).



21. ábra A relatív $\bullet\text{OH}$ gyöktermelő képesség vizsgálata. A szülői törzs $6chr^+$ (—) és Cr(VI) szenzitív mutánsának $chr-51S$ (----) feltárt sejtekkel mért EPR spektrumát 5 perccel az összekeverés után mértük, 0.1 M PBN $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ nélkül (a) és 2 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -al (b). A $6chr^+$ törzs (c) és a $chr-51S$ mutánsa (d) (—) 2 mM NADPH-val vagy (----) 2 mM NADPH-val és 3 mM H_2O_2 -al PBN-t és Cr(VI)-ot tartalmazó oldatban. A spektrométer beállításai: modulációs amplitudó, 1.6 G; a mérés időtartama, 400 másodperc; mért terület, 3482 ± 50 G.

A kísérleti eredményt a mutánsban a megnövekedett GR specifikus enzimaktivitás magyarázza, amely külsőleg adott NADPH jelenlétében hatékonyan redukálta az oldatban levő

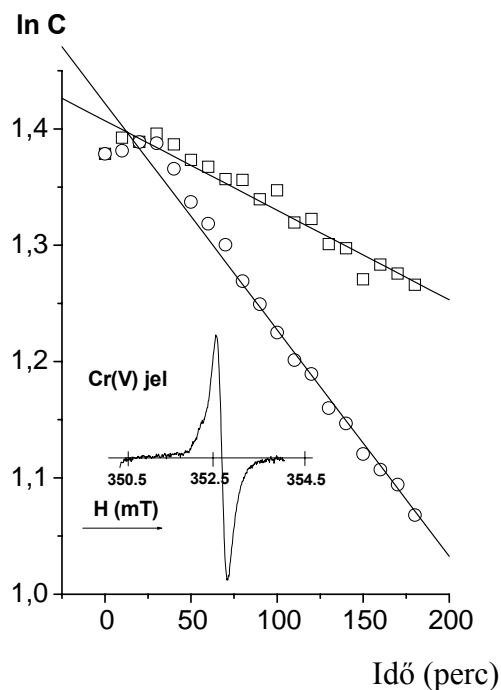
Cr(VI)-ot Cr(V)-é és ezen keresztül fokozta a PBN-OH képzést. Ha egyidőben 2 mM NADPH és 3 mM H₂O₂ –t adtunk a feltárt sejtekhez, a szülői törzsben a PBN-OH növekedés 100%-os volt, míg a mutánsban csak 15%-al nőtt a PBN-OH mennyisége (21.c és d ábra). Ez a kísérlet egy indirekt bizonyítéka az alacsonyabb intracelluláris H₂O₂ koncentrációnak a szülői törzsben.

A fenti kísérletek tehát egyértelműen azt mutatják, hogy a mutáns törzs redukációs kapacitása a króm intermedierek koncentrációjának a növekedését, így króm felhalmozást, a magasabb oxidációs képessége pedig megnövekedett •OH gyök képzést eredményezett, amely, szemben a szülői törzssel Cr(VI) szenzitív fenotípus formájában nyilvánul meg.

5. 2. 2. A *chr1-66T* króm(VI) toleráns mutáns jellemzése.

Ebben a kísérletsorozatban a Cr(VI) toleráns *chr1-66T* mutánson végzett mérési eredményeket viszonyítottuk a szülői törzs *6chr⁺* eredményeihez. **Korábbi mérésekből** tudjuk, hogy a $K_2Cr_2O_7$ minimális gátló koncentráció a szülői törzs esetében $225 \mu M$, míg a toleráns mutánsnál $275 \mu M$ volt. Azt is tudtuk, hogy a CrO_4^{2-} bioakkumulációja szignifikánsan alacsonyabb volt a toleráns mutánsnál, mint a szülői törzsben (Czakó és mtsi. 1999). Mindkét törzs haploid, megegyezik a generációs ideje és a sejttérfogata. A *chr1-66T* mutáns tetrádanalízise bizonyította a stabil Cr(VI) toleranciáját, valamint, hogy egy génes mutáció történt a mutagénkezelés során (Czakó és mtsi. 2004). Korábban elvégzett kísérleteinkből tudjuk, hogy Cr(VI) adása után a CrO_4^{2-} anionok serkentett diffúziója a sejtekbe azonnal megkezdődik, 120 perces $250 \mu M$ -os $K_2Cr_2O_7$ előkezelés után a *chr1-66T* mutáns feleannyi Cr(VI)-ot halmozott fel, mint a szülői törzs (Belágyi és mtsi. 1999).

Ezen ismeretek birtokában megmértük a *chr1-66T* mutáns és a szülői törzs Cr(V) redukáló képességének időfüggését EPR spektroszkópiával (Cr(V) redukciós kapacitását) (22. ábra).



22. ábra A Cr(V) koncentrációjának időfüggése a *S. pombe* vad törzsének *6chr⁺* (○) és Cr(VI)-toleráns *chr1-66T* mutánsának (□) $25^\circ C$ -on. Hogy jobban demonstráljuk a kinetikai folyamat különbségét a két törzs között, a Cr(V) koncentráció kiinduló értékét a startnál ugyanarra az értékre állítottuk be.

A 22. ábra adatai alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét törzs redukálja a Cr(VI)-ot Cr(III)-á Cr(V)-ön keresztül, viszont a mutáns törzs Cr(V) redukciós aktivitása jóval alacsonyabb a szülői törzsnél, de a csökkenés mértéke nem olyan mértékű, mint amennyire a korábban bemutatott szenzitív mutáns redukciós képessége megnőtt.

A 2. táblázatban láthatjuk, hogy a jelenség társult egy csökkent GSH és szignifikánsan csökkent specifikus GR aktivitással (amely enzim a NADPH mennyiségének a rovására redukálja a GSSG-t, ezáltal a glutation reduktáz kulcsfontosságú antioxidáns enzim), valamint ezzel párhuzamosan megnövekedett a G6PD enzim (amely kulcsenzime a pentóz-foszfát ciklusban keletkező NADPH-nak) specifikus aktivitása (2. táblázat).

2. táblázat

A. S. pombe szülői törzsének *6chr*⁺ és Cr(VI) toleráns mutánsának *chr1-66T* specifikus GSH, GSSG, és ET (szuperoxid gyök) koncentrációja és specifikus G6PD, GR, GPx, GST, SODs és kataláz aktivitása.

	Szülői törzs <i>6chr</i> ⁺	Cr(VI)-toleráns mutáns <i>chr1-66T</i>
GSH ^b	58 ± 11.0	27 ± 4.3 ^{***}
GSSG ^b	0.34 ± 0.09	0.2 ± 0.12
GSSG/GSH	170 ± 55	135 ± 84
ET ^b	0.047 ± 0.007	0.09 ± 0.01 ^{***}
G6PD ^c	119 ± 16	150 ± 11 ^{**}
GR ^c	29 ± 2.4	15 ± 1.6 ^{***}
GPx ^c	3.0 ± 0.95	2.8 ± 0.41
GST ^c	18 ± 5.0	21 ± 1.9
SOD ^d	3.4 ± 0.82	2.6 ± 0.18
SOD _{Mn} ^d	1.6 ± 0.22	1.0 ± 0.15 [*]
SOD _{CuZn} ^d	1.8 ± 0.85	1.6 ± 0.23
Kataláz ^e	20.6 ± 1.7	16.4 ± 1.3 [*]

Specifikus értékeket átlag ± S. D. formában fejeztük ki, 4 független kísérlet értékeiből kiszámolva.

^b Specifikus koncentráció nmol (mg protein)⁻¹ adtuk meg

^c Specifikus aktivitást nmol (min. mg protein)⁻¹ adtuk meg

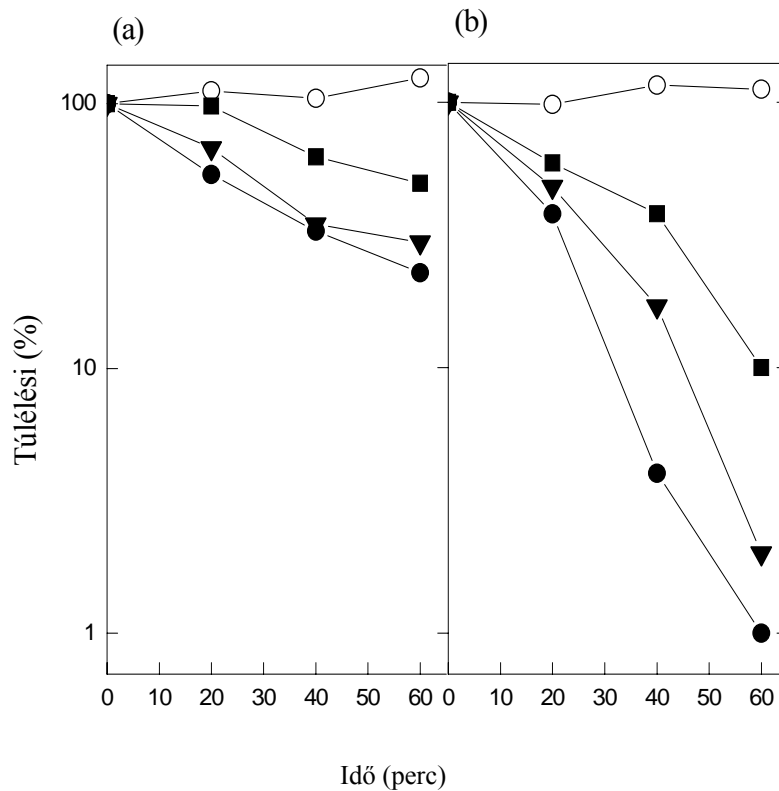
^d Specifikus aktivitást egység (min mg protein)⁻¹ adtuk meg

^e Specifikus aktivitást μmol (min. mg protein)⁻¹ adtuk meg

* p < 5%; ** p < 1%; *** p < 0.1%. p értékeket a t-próba segítségével számoltuk ki.

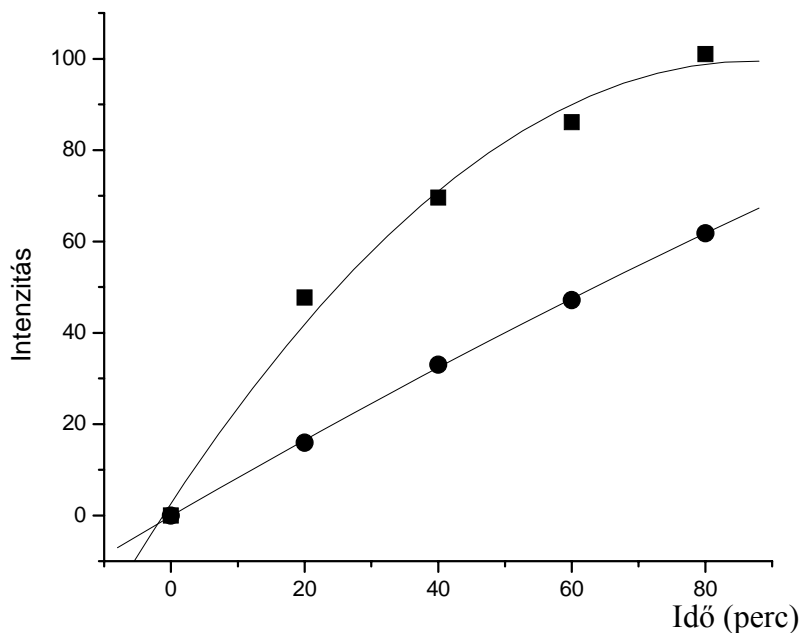
Ami még meglepő eredmény, hogy a MnSOD specifikus aktivitása szignifikánsan alacsonyabb, ami magyarázhatja az intracelluláris szuperoxid gyök kétszer akkora mennyiségét (a módszer miatt a szuperoxid gyök mennyisége etidium-bromidra van kalibrálva és ET-vel van rövidítve). Ha ezen eredményeket összevetjük a szenzitív mutáns eredményeivel, ahol a GSH hasonló mértékű csökkenését tapasztaltuk, megállapíthatjuk, hogy a GR specifikus aktivitásának van meghatározó szerepe *in-vitro* körülmények között a Cr(VI) redukálásában és ezt nem befolyásolja a G6PD specifikus aktivitás növekedése, ami valószínűleg NADPH túltermeléssel járt. Ezt onnan is tudjuk, mivel az izolált GR-al végzett kísérletek során a NADPH maga csak kis mértékben tudta redukálni a Cr(VI)-ot, míg az enzim és a NADPH együttes hatására nagyságrendekkel nőtt a keletkezett Cr(V) mennyisége. Ezért is mondhatjuk azt, hogy a redukcióban jóval nagyobb szerepe van a GR aktivitásnak, mint a NADPH termelésnek.

Megvizsgáltuk a törzsek ellenálló képességét oxidatív stresszorokkal és Cd^{2+} -al szemben. A *chr1-66T* mutáns hiperszenzitívnek bizonyult az összes külsőleg adott oxidatív stresszorokkal szemben, a H_2O_2 -al, MD-al, tBOOH-al és Cd^{2+} -al. A felsorolt oxidatív stresszorok hatását a 23. ábra szemlélteti. Amikor 60 percen keresztül kezeltük a törzseket CdCl_2 -al, a vad törzsnél a sejtek túlélése 36 % volt, a toleráns mutánsnál 8 % volt. Itt kell megjegyeznünk, hogy a toleráns mutáns oxidatív stresszel szembeni érzékenysége tette lehetővé, hogy a későbbi transzformációs kísérleteknél a toleráns és a normál fenotípusú törzsek indirekt szelekcióját végrehajtsuk egy sejt szinten, amely egyben alkalmas lehet stresszérzékeny mutánsok hatékony izolálására, dúsítására.



23. ábra *S. pombe* szülői törzs $6chr^+$ (a) és Cr(VI)-toleráns mutáns $chr1-66T$ (b) túlélési görbéje. Közép-log fázisú sejtek kezeletlen (○), kezelt 40 mM H₂O₂-al (●), 6 mM MD-al (▼), és 0.5 mM tert-BOOH-al (■).

A 24. ábrán láthatjuk, hogy peroxid gyökök koncentrációja alacsonyabb a Cr(VI)-toleráns mutánsban, ami társul az antioxidáns enzimek közül a GR és a kataláz alacsonyabb specifikus enzimaktivitásával. Ezzel szemben a szuperoxid gyök koncentráció magasabb a toleráns mutánsban, amely valószínűsíthetően a mitokondriálisan lokalizált alacsonyabb specifikus aktivitású MnSOD következménye (2. táblázat).

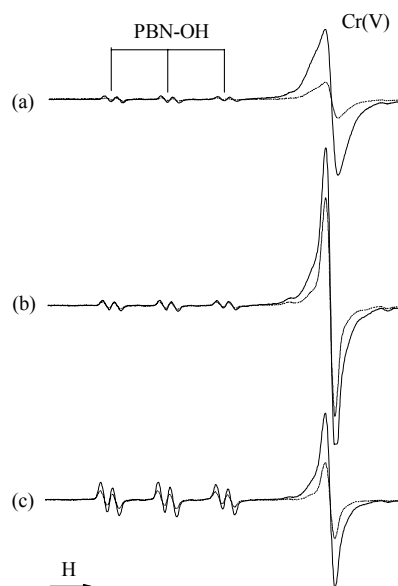


24. ábra A peroxid koncentráció meghatározása a *S. pombe* Cr(VI)-toleráns *chr1-66T* mutánsánál (●) és szülői törzsénél *6chr⁺* (■). A DHR 123 átalakulását fluoreszkáló rodaminná Perkin Elmer fluoriméter segítségével ($\lambda_{\text{ex}} = 500$ és $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm) határoztuk meg.

A toleráns mutáns csökkent Cr(VI) redukációs kapacitását (amelyet a 22. ábrán a Cr(V) redukáló képességének a mérésével már alátámasztottunk) feltárt sejteken végzett *in vitro* EPR vizsgálatok megerősítették, valamint az eddigiekben ismertetett *in vivo* kísérleti eredményeket feltárt mintákkal támasztottuk alá (25. ábra).

Feltárt sejteket 5 percig kezeltük 2 mM kálium-bikromáttal. A *chr1-66T* mutánsnál szignifikánsan alacsonyabb Cr(VI) koncentrációt (10,3 μM) mértünk, mint a szülői *6chr⁺* törzsénél (59 μM) (25.a ábra). Ezek a kísérleti eredmények mellett, hogy jó egyezést mutattak a korábbi EPR kísérleti eredményekkel (22. ábra), bizonyították a toleráns mutáns alacsonyabb Cr(VI) redukációs képességét, amellyel alátámasztotta azt az elméletünket, miszerint ok-okozati kapcsolat van a *chr1-66T* mutáns csökkent Cr(VI) redukációs kapacitása és alacsonyabb Cr(VI) bioakkumulációja között. Ezek az eredmények jó egyezést mutatnak a korábbi megfigyeléseinkkel, miszerint a Cr(VI) szenzitív fenotípusú *chr-51S* mutáns megnövekedett Cr(VI) bioakkumulációt és gyors Cr(V) redukációs képességet mutatott. Ezt támasztotta alá az a mérési eredményünk is (25.b ábra), amikor 2 mM Cr(VI)-hoz 2 mM NADPH-t adtunk egyidőben a feltárt sejtekhez. A toleráns mutánsnál 2,8-szeres volt a növekedés (10,35-ről 27,7 μM -ra), míg a *6chr⁺* törzsénél a NADPH nem növelte érdemben a Cr(V) mennyiségét (59,0-ről 59,3 μM -ra nöött), tehát a toleráns mutánsnak még NADPH

adására sem nőtt meg annyira a Cr(VI) redukáló képessége, mint amennyi Cr(V)-öt a szülői törzs alapállapotban képes előállítani. Ezért, a G6PD enzim által termelt nagyobb mennyiségű NADPH nem tudja ellensúlyozni a glutation reduktáz enzimaktivitás miatti csökkent redukációs kapacitást. Ezek az adatok szintén alátámasztották jelentőségét a GR/NADPH rendszernek a sejtek Cr(VI) redukálásában, hogy az nem csak *in vitro*, de *in vivo* is felelős az intracelluláris króm redukációs folyamatokért. Ha a feltárt törzseket 5 percig kezeltük 3 mM H₂O₂-al is a Cr(VI) és a H₂O₂ mellett (25.c ábra), akkor a króm(V) koncentráció a Fenton-reakció miatt lecsökkent mindkét törzsnél, a szülő *6chr*⁺-nál 59,0 μM-ról 28,6 μM-ra, míg a *chr1-66T* mutánsnál 10,4 μM-ról 8,8 μM-ra. A [•]OH gyök mennyisége is, hasonlóan a Cr(V) mennyiségéhez, alacsonyabb a *chr1-66T* toleráns mutánsban minden összeállított kísérleti körülménynél. Ezek a kísérletek azt is mutatták, hogy a PBN-OH addukt képzés függ a redukánsok és oxidánsok relatív koncentrációjától.



25. ábra A szülői törzs $6chr^+$ (—) és Cr(VI) toleráns mutánsának $chr1-66T$ (----) feltárt sejtekkel mért EPR spektrumát 5 perccel az összekeverés után mértük 0.1 M PBN-t tartalmazó pufferban (pH: 7.2), (a) 2 mM $K_2Cr_2O_7$, (b) 2 mM $K_2Cr_2O_7$ és 2 mM NADPH, (c) 2 mM $K_2Cr_2O_7$, 2 mM NADPH és 3 mM H_2O_2 .

6. Eredmények értékelése

6. 1. A króm(III) hatása *C. albicans* élesztő sejtek plazmamembránjára

A króm(III) vegyületeknél *in vivo* mutagén hatás nem bizonyított. Valószínű ennek elsődlegesen az az oka, hogy a vízben oldott Cr(III) vegyületek nem jutnak keresztül a plazmamembránon (Leonard és Lauwerys, 1980). Ugyanakkor, laboratóriumi kísérletekben bizonyított tény, hogy a Cr(III) aminosavakkal alkotott komplexe a plazmamembrán számára átjárható és így a sejtbe jutott króm kation megzavarhatja a sejt életfolyamatait, csökkentve a transzkripció pontosságát, ionos formában DNS-hez kötődve, a DNS átírásának zavarásával már mutagén hatású lehet (Standeven és Wetterhahn, 1989). Ezen kísérleti adatok ismeretében már érthető, miért tartottuk fontosnak a króm plazmamembránra gyakorolt hatásának vizsgálatát, hiszen a magas króm(III) tartalmú szennyvizek vagy szennyvíziszapok kezelésénél, tárolásánál, ez lényeges információ lehet, hogy a környezetterhelést ne fokozzuk tovább rossz technológia alkalmazásával. Például a bányászati szennyvizekben a Cr(III) koncentrációja elérheti a 72,4 mg/l-t (Walsh és O'Halloran, 1996).

Kísérleteink kezdetekor tudtuk, hogy a *S. cerevisiae* törzseknél a sejtek számára felvehető de magas koncentrációban stresszt okozó réz(II) ion módosítja a sejtek plazmamembránjának karrier funkcióját (Ohsumi és mtsi 1988). Ugyanezeknél az egysejtű eukarióta élesztőnél hasonló eredményről számoltak be Ca^{2+} és Cu^{2+} kezelés hatására (Howlett és Avery 1997). Ugyanakkor nyilvánvaló volt, hogy a fent említett három ion a sejtbe jutva más és más hatásmechanizmuson keresztül károsítja a sejteket. Hangsúlyozandó, hogy ez a sejtkárosítás elsődlegesen a sejt belüli folyamatokon keresztül nyilvánul meg. Ezen vegyületekkel szemben a Cr(III)-plazmamembrán vizsgálata ezért tűnt fontosnak, mert itt valószínűsíthető volt, hogy a sejtszaporodás gátlása és a sejtek pusztulása kizárólag a plazmamembrán károsodására vezethető vissza.

Az Eredmények fejezetben bemutatott változások azt valószínűsítik, hogy a Cr(III) kation a plazmamembrán negatív töltésű régióiban lokalizálódik, keresztkötésű hidakat képez a foszfolipid molekulák és a negatív töltésű aminosav molekulák között a fehérjeláncoknál. Ezek a kölcsönhatások csökkentik a plazmamembránba lokalizált hidroxil csoportok stabilitását és megváltoztatják a membrán proteinek körüli foszfolipid réteg elrendeződését. Ezek a molekuláris elrendeződések azok, amelyek a sejt életéhez nélkülözhetetlen, barrier funkció vesztését eredményezi és ezen keresztül a sejtszaporodás leállítását és a sejt pusztulását okozzák.

6. 2. A Cr(VI) hatásmechanizmusának vizsgálata.

Az élővilág genetikai sokfélesége és az ebből származó anyagcsereutak változatossága arra utal, hogy a toxikus fémvegyületek, ezen belül a krómvegyületek hatásmechanizmusa jelentősen eltérhet a különböző élőlénycsoportoknál, függhet a sejt, szövet típusától, ezért kívánatos leszűkíteni a területet az élesztő kutatások eredményeire. Élesztőknél jelentős ismeretek halmozódtak fel a krómvegyületek fölvételével, ezen belül a bioadszorpcióval és bioakkumulációval kapcsolatban (Aaseth és mtsi., 1982; Cervantes és mtsi., 2001). A króm biológiai hatása egy eléggé összetett folyamat, amely jelentősen függ a vizsgálandó sejt fajtájától és aktuális redox állapotától. Az eukarióta élőlények közül a gomba modellszervezetek elsődleges fontosságúak a krómium toxicitás molekuláris biológiai hátterének a felderítésében. A molekuláris mechanizmusra vonatkozó kutatások közül Ono és Weng (1982) közöl figyelemreméltó eredményeket, nevezetesen, klasszikus genetikai vizsgálataik alapján azt valószínűsítették, hogy egy összetett, többlépcsős, több gén által meghatározott folyamatról van szó. A krómium tolerancia vizsgálatában mindennapos eljárás volt a Cr(VI) rezisztens mutánsok szelekciója a *Saccharomyces sp.* (Ono és Weng, 1982), *Candida sp.* és *Rhodosporidium sp.* fajoknál (Baldi és mtsi., 1990; Pepi és Baldi, 1992). Függetlenül attól, hogy króm szenzitív vagy toleráns mutánsokat króm szennyezett környezetből vagy indukált mutagenézissel nyertek, vizsgálataik alapján bizonyítottnak tekinthető, hogy a Cr(VI)-al szembeni tolerancia ezen mutánsoknál a csökkent Cr(VI) bioakkumulációnak tulajdonítható, míg a szenzitivitás a megnövekedett Cr(VI) felhalmozásának (Ono és mtsi., 1982; Baldi és mtsi., 1990; Pepi és Baldi, 1992; Cohen és mtsi., 1993; Czakó és mtsi., 1999). A kísérletes munkákban ismertetett megközelítést eddig nem végeztek más laborokban.

6. 2. 1. A Cr(VI) szenzitivitás molekuláris mechanizmusa.

A Cr(VI) szenzitív *chr-51S* mutánsban a Cr(VI) bioakkumuláció és a Cr(VI) redukció egy kétfázisú, hasonló sémájú folyamat (Rauser 1995; Belágyi és mtsi., 1999;), azt sugallva, hogy a Cr(VI) anionok bioakkumulációja és redukciója egy szorosan összekapcsolt folyamat a sejtekben. Ez azt jelenti, hogy a Cr(VI) molekulák serkentett diffúzióval történő felvételét a plazmamembrán nem-specifikus szulfát transzporterjén keresztül a gyors enzimátikus és nem-enzimátikus redukció tartja fenn.

Shi és mtsi. (1999) több mint egy évtizedes kutatási programukban *in vitro* EPR kísérletekkel bizonyították, hogy a Cr(VI) redukció egy elektron átadással végbemegy alacsony

molekulasúlyú vegyületek, úgy mint glutation, az élesztősejtekben nem található aszkorbinsav, E-vitamin jelenlétében, valamint GR/NADPH redukciós folyamatban. A kísérleti rendszerük nem tette lehetővé, hogy az élő szervezetben a folyamat összetettségét, egymáshoz való viszonyát elemezzék. Az utóbbi néhány év az oxidatív stressz kutatásban rámutatott az alternatív stresszmechanizmusok létre, nevezetesen a tioredoxin és a tioredoxin-reduktáz rendszer működésére a *S. cerevisiae*-ben. Még nem ismerjük ezen molekulák jelentőségét a króm hatásmechanizmusában (Jamieson 1998), mint ahogy jövőbeni terveink között szerepel, hogy vizsgáljuk *S. cerevisiae*-nél az egyetlen ismert fémkötő peptid, a glutationból szintetizálódó fitokelatinok szerepét. Úgy véljük, hogy kísérleteink megnyugtató választ adtak a redukciós folyamat meghatározó elemeire a *S. pombe*-nél.

6.2.1.1. A Cr(VI) nem enzimátikus redukciója

A nem-enzimátikus reduktánsok közül a glutationnak van elsődleges szerepe a Cr(VI) intracelluláris redukciójában. A Cr(VI) és a GSH reakciója során megnő az instabil, reaktív, Cr(V) és Cr(IV) oxidációs állapotú króm intermedierek mennyisége (Shi és Dalal, 1989; Liu és mtsi., 1996; Liu és mtsi., 1997; Shi és mtsi., 1999). Patkány oszteoblasztokkal végzett kísérleteknél, az N-acetil cisztein hatására megemelkedett a GSH koncentráció, amelynek megnövekedett DNS károsodás lett a következménye (Ning és Grant, 2000). Viszont ha *S. pombe* sejteket előkezelnék CdCl₂-al, amely csökkenti a GSH mennyiségét a sejtekben, akkor Cr(VI) kezelés hatására csökkent a túlélő sejtek száma (Grill és mtsi., 1986). Ezzel a megállapítással látszólag ellentmond csirkeembrióval végzett kísérlet, mely szerint a Cr(VI) indukált DNS károsodás csökkent, ha GSH-ra éhezett sejtekben (Cupo és Wetterhahan, 1985), míg a megnövelt GSH szint fokozta a DNS károsodást.

6.2.1.2. Enzimek szerepe a Cr(VI) redukcióban

In vitro kísérletek bizonyították, hogy a Cr(VI) redukció folyamán Cr(IV)-GSH komplex képződik, amely komplex felbomlása során létrejött glutationil gyökök összekapcsolódásával oxidált glutation jön létre. Az oxidált glutation sejtek számára túl magas koncentrációját úgy is csökkentheti a glutation reduktáz enzim által katalizált redukció mellett a sejt, hogy a glutation S-transzferáz enzim segítségével eltávolítja a sejtől az oxidált glutationt. Az előbb említett króm-GSH komplexet ki is ürítheti a sejt az extracelluláris térbe, vagy intracellulárisan felhalmozhatja. A glutation S-transzferáz enzim specifikus aktivitásában bekövetkezett majdnem kétszeres növekedés a szenzitív mutánsban alátámasztotta ezen ismereteket, és megmagyarázta, hogy miért nincs szignifikáns különbség a szülői és a

szenzitív mutáns oxidált glutation koncentrációja között. A ezen eredmények megmagyarázták a korábbi megfigyeléseinket is, nevezetesen, hogy a szenzitív mutáns jelentősebb mennyiségű krómot halmoz fel a sejtben, mint a szülői törzs (Czakó és mtsi., 1999), de nem adtak választ arra, hogy a szenzitív fenotípus, azaz a nagyobb mértékű sejtpusztulás miért következik be a *chr-51S* Cr(VI) szenzitív mutánsnál.

Egy másik lehetséges útja a Cr(VI) egy-elektronos redukciónak a *S. pombe* GR enzimje által katalizált reakció, egy NADPH/flavoenzim általi Cr(VI) redukció, amit *in vivo* és *in vitro* körülmények között is vizsgáltak (Wiegand és mtsi., 1985, Shi és Dalal, 1990c és 1992). A sarjadzó élesztő *S. cerevisiae*-nél, a NADPH/NADP⁺ és a GSH/GSSG redox egyensúly szabályozása szoros kapcsolatban van a glutation reduktáz enzim működésével (Liobell és mtsi., 1988). Az *S. pombe* sejtekben a *pgr1*⁺ gén által kódolt GR nélkülözhetetlen aerob körülmények közötti növekedésnél, viszont *S. cerevisiae* és *E. coli* sejtekben nem elengedhetetlen az enzim működése. A Pap1 transzkripció faktor szabályozza a *pgr1*⁺ gén kifejeződését *S. pombe*-ban különböző stressz körülmények között. A *pap1* gén kódol egy AP-1 homológ szabályozó fehérjét. A *pgr1*⁺ diszruptáns génjét tartalmazó spórák életképtelenek, míg a *pgr1*⁺ gén túlzott kifejeződése a sejteket menadionnal szemben ellenállóvá teszi, H₂O₂-al szemben viszont ez a hatás nem érvényesül (Lee és mtsi., 1997).

	Szülői törzs <i>6chr</i> ⁺	Cr(VI)-szenzitív mutáns <i>chr-51S</i>	Cr(VI)-toleráns mutáns <i>chr1-66T</i>
GSH ^b	58 ± 11.0	32 ± 2.8 ^{***}	27 ± 4.3 ^{***}
GSSG ^b	0.34 ± 0.09	0.22 ± 0.10	0.2 ± 0.12
GSH/GSSG	170 ± 55	145 ± 67	135 ± 84
G6PD ^c	119 ± 16	218 ± 28 ^{***}	150 ± 11 ^{**}
GR ^c	29 ± 2.4	71 ± 9.3 ^{***}	15 ± 1.6 ^{***}
GST ^c	18 ± 5.0	32 ± 4.3 ^{**}	21 ± 1.9
SOD ^d	3.4 ± 0.82	3.8 ± 0.78	2.8 ± 0.41
SOD _{Mn} ^d	1.6 ± 0.22	1.7 ± 0.07	1.0 ± 0.15 [*]
SOD _{CuZn} ^d	1.8 ± 0.85	2.1 ± 0.80	1.6 ± 0.23
Kataláz ^e	20.6 ± 1.7	19.8 ± 3.3	16.4 ± 1.3 [*]
GP _x ^e	3.0 ± 0.95	3.0 ± 0.56	2.6 ± 0.18
Indukált kataláz ^{e*}	34.1 ± 2.5 ^{***}	27.8 ± 3.1 [*]	39.4 ± 4.2 ^{***}
ET ^b	0.047 ± 0.007	0.077 ± 0.010 ^{**}	0.09 ± 0.01 ^{***}

3. összefoglaló táblázat. A *S. pombe* szülői törzsének *6chr*⁺, Cr(VI) szenzitív *chr-51S* és toleráns mutánsának *chr1-66T* specifikus GSH, GSSG, és etidium-bromid koncentrációja és specifikus G6PD, GR, GPx, GST, SODs és kataláz aktivitása.

A *chr-51S* Cr(VI) szenzitív mutáns megnövekedett Cr(VI)→Cr(V) redukáló képességét (17. ábra) jól magyarázza a szignifikánsan megnőtt GR és G6PD specifikus enzimaktivitás (3. táblázat), bár az intracelluláris GSH mennyisége jelentősen csökkent a mutáns törzsben (3. táblázat). A *S. cerevisiae*-ből és a saját *S. pombe* törzsünkéből izolált GR képes hatékonyan redukálni a Cr(VI)-ot Cr(V)-é NADPH jelenlétében *in vitro* körülmények között (20. ábra). Azonban, az *in vivo* kísérlet során bebizonyosodott, hogy az alacsonyabb GSH tartalom ellenére a *chr-51S* mutánsban a megnövekedett GR és G6PD specifikus enzimaktivitás szignifikánsan magasabb ($36 \pm 12\%$) $\bullet\text{OH}$ gyök termelő képességet mutatott, mint a szülői törzsben. Ennek oka a megnövekedett kromát és intracelluláris peroxid koncentráció. Ezen megfigyelések alátámasztják, hogy nem a GSH, hanem a GR/NADPH a fő redukációs rendszer a *S. pombe*-nál. Oszteoblaszt sejteken végzett kísérlet során karmusztinnal gátolták a GR enzim aktivitását, amely így mérsékelte a Cr(VI) citotoxicitását, így bizonyítva, hogy a Cr(VI) citotoxicitás független az intracelluláris GSH szinttől, amely kísérlet így jó egyezést mutat az általunk bemutatott eredményekkel (Ning és Grant, 2000). Ugyanakkor ezek a szerzők más lehetséges redukációs folyamatokat ill. Haber-Weiss reakciót befolyásoló vizsgálatokat nem végeztek. Ezért úgy véljük, hogy vizsgálatainkban kimutatott, megnövekedett redukációs képessége a szenzitív sejteknek, amely egyidőben társult a króm intermedierek reoxidációjához szükséges intracelluláris peroxid koncentráció emelkedéssel, együttesen eredményezte a Cr(VI) szenzitív fenotípust.

6.2.1.3. A szabad gyökök szerepe

Széles körben elfogadott nézet, hogy a Cr(VI) vegyületek cito- és genotoxikus hatását a Cr(V) és a H_2O_2 között létrejövő Fenton típusú reakció által termelődött $\bullet\text{OH}$ gyök okozza (Shi és Dalal, 1990a és 1990b). A $\bullet\text{OH}$ gyök és a GSH közötti reakció eredményeként keletkezik a kevésbé reakcióképes $\text{GS}\bullet$ gyök (Halliwell és Gutteridge, 1999). A magas intracelluláris GSH koncentráció a szülői törzsben *6 chr⁺* (1. táblázat) valószínűleg fontos szerepet játszik a Cr(V) által termelődött $\bullet\text{OH}$ gyökökkel szembeni védekezésben. A szenzitív mutánsban *chr-51S* megfigyelt szignifikánsan alacsonyabb GSH tartalom hozzájárul a Cr(VI) szenzitív fenotípushoz. Ráadásul a szenzitív mutánsban a kataláz enzim kevésbé indukálható, mint a szülői törzsben, amely így tovább gyengíti az oxidatív stressz elleni védekezését a mutáns törzsnek (1. táblázat). A kataláz alapvetően fontos antioxidáns enzim, funkciója, hogy a H_2O_2 molekulákat szétbontsa és ezáltal megakadályozza, hogy a Fenton-típusú folyamat során $\bullet\text{OH}$ gyökök keletkezzenek. A *chr-51S* szenzitív mutáns igyekszik ellenőrzése alatt tartani az intracelluláris szabad gyökök mennyiségét, valamint a GST enzim indukciója által

minimális szinten tartani a toxikus intermedierek által okozott sejt sérüléseket, de ez az egyedüli erőfeszítés nem elégséges. Klasszikus és molekuláris genetikai kutatások folynak, hogy megmagyarázzuk a *chr-51S* mutánsnál megfigyelt Cr(VI) szenzitivitás genetikai hátterét.

Utalnunk kell arra is, hogy a GSH fontos reduktáns a sejtekben, scavenger funkcióval rendelkezik (Gille és Sigler, 1994), ezért valószínűsíthető, hogy a szenzitív mutánsban a csökkent GSH szint, amely érdemben nem befolyásolta a sejt redukciós kapacitását, viszont hozzájárulhatott az $\cdot\text{OH}$ gyök semlegesítésének csökkent képességéhez, a Cr(VI) érzékeny fenotípus kialakulásához.

Összegezve: Kimutattuk, hogy a Cr(VI) szenzitív fenotípusú a *S. pombe chr-51S* sejteknek a mutáns megváltozott anyagcsere-aktivitásának a következménye, amely magában foglalja

(i) a jelentősen megnőtt GR/NADPH aktivitást, amely fokozza a Cr(VI) \longrightarrow Cr(III)

redukciót és serkenti az intracelluláris krómfelhalmozást,

(ii) a szignifikánsan csökkent GSH koncentráció, amely gátolja a hatékony $\cdot\text{OH}$ gyök eliminációt,

(iii) az alulszabályozott kataláz aktivitás, amely nem teszi lehetővé a Fenton-típusú $\cdot\text{OH}$ képzés gátlását.

6. 2. 2. A Cr(VI) tolerancia molekuláris mechanizmusa.

A kísérletsorozatban szereplő két mutánsok eredményeinek együttes értékelése adhatja meg a célkitűzésekben szereplő fölvetésekre a választ. Mindkét törzsnél közel felére csökkent a legfontosabbnak tartott intracelluláris GSH koncentráció, mégis két ellentétes irányultságú, Cr(VI) szenzitív illetve toleráns fenotípust figyelhetünk meg. Ezt az mutatja, hogy nem a GSH a meghatározó a Cr(VI) redukcióban.

Az oxidatív stresszre való érzékenységet már korábban leírták GSH hiányos és megváltozott GSH metabolizmust mutató *S. pombe* és *S. cerevisiae* mutánsoknál (Izawa és mtsai. 1995, Stephen és Jamieson 1996, Carmel-Harel és Storz 2000, Weghe és Ow 2001). Ez a csökkent redukciós kapacitás azonban nem jár a Cr(VI) felvétel csökkenésével, ahogy ezt Cr(VI)⁵¹ izotóp felvételi kísérleteink bizonyították (Czakó és mtsi., 2004). A Cr(VI) szenzitív törzsnél a GR specifikus aktivitás jelentős növekedése, míg a toleránsnál jelentős csökkenése figyelhető meg, amely azt mutatja, hogy a GR/NADPH enzimrendszer játszik kulcsszerepet a Cr(VI) redukcióban. A króm(VI) toleráns mutánsnál a csökkent glutation reduktáz specifikus enzimaktivitás társult egy megnövekedett oxidatív stressz érzékenységgel, amelynek ésszerű

magyarázata a csökkent, mitokondriumban lokalizálódó MnSOD aktivitás, melynek a következménye a megemelkedett szuperoxid-gyök koncentráció. A *S. pombe* két szuperoxid-dizmutáz enzimmel rendelkezik, a citoplazmában működő CuZn-SOD-al, és a mitokondriumban található Mn-SOD-al. A Mn-SOD-nak - amelyet a *sod2⁺* gén kódol a *S. pombe*-ban - fontos szerepe van az antioxidáns védelmi rendszer működésében, védve a sejtet a mitokondriumban nagy számban keletkező keletkező szuperoxid gyöktől (Galiazzo és mtsi, 1994., Emri és mtsi., 1999., Jeong és mtsi., 2001). Az alacsonyabb specifikus enzimaktivitású Mn-SOD így kisebb mennyiségű hidrogén-peroxidot (mellette O₂-t) termel a keletkezett szuperoxid-gyökből, amely így szintén hozzájárul a *chr1-66T* mutáns Cr(VI) toleranciájához. A két mutáns intracelluláris H₂O₂ koncentrációját figyelembe véve a Cr(VI) szenzitivitás magas, a tolerancia alacsony H₂O₂ jelenlétét mutatja. Ugyanakkor a toleráns mutánsban a szuperoxid-gyök koncentráció megemelt szintje arra utal, hogy a Fenton-típusú reakcióban a szuperoxid gyök szerepe nem jelentős, csak a H₂O₂ az, ami a Fenton reakción keresztül jelentősen hozzájárul a króm-érzékenységhoz. Ezen eredményeket alátámasztották feltárt sejteken végzett EPR kísérleteink, ugyanis méréseink szerint a [•]OH gyökök keletkezésének mértéke arányos az intracelluláris Cr(V) és H₂O₂ koncentrációjával, nemcsak *in vitro*, de *in vivo* is (Shi és Dalal, 1990a., Shi és mtsi. 1999.).

A Cr(VI) vegyületek cito- és genotoxikus hatásának egyik fő okozója a Fenton-típusú Haber-Weiss reakcióban H₂O₂ hatására keletkező [•]OH gyök. (25. ábra). A H₂O₂ mellett a szuperoxid-gyök is részt vesz a Haber-Weiss reakcióban, ugyanis Cr(VI)-ot képes redukálni Cr(V)-é, ezáltal [•]OH gyököt termelni (Shi és Dalal, 1990a., 1990b). A Cr(VI) Cr(V)-é redukálása során a GR enzim közvetett segítségével, Cr(V) és H₂O₂ kölcsönhatásából hidroxil gyök keletkezik kísérőként, ez a gyöktúltermelés okozza a szenzitív fenotípust (Pesti és mtsai. 2002), miközben a csökkent GR specifikus enzimaktivitás vezetett egyben a Cr(VI) tolerancia megnyilvánulásához, másrészt az oxidatív stressz érzékeny fenotípushoz, ami a *chr1-66T* törzsnél figyelhattunk meg.

Ugyanakkor tudjuk Lee és mtsi. munkája alapján (1997), hogy a *S. pombe*-nél egy a hármas kromoszómán lokalizálódott gén, a *pgr1⁺* gén felelős a glutation reduktáz szintéziséért. Ez alapján valószínűsíthetjük, hogy a *chr1-66T* mutánsnál ez a gén vagy ennek regulációjáért felelős transzkripció faktor (*pgr1⁺*) a felelős.

Összefoglalva megállapítható:

A *S. pombe chr1-66T* Cr(VI) toleráns mutáns fenotípusa valószínűleg a glutation reduktáz *pgr1⁺* génjében bekövetkezett egygénes mutáció vagy a *pap1-atf1* transzkripció útvonalan bekövetkezett mutáció eredménye, amely mutáció csökkentette

(i) mind a GR specifikus enzimaktivitást és a GSH tartalmat, ezáltal csökkentette a Cr(VI) redukáló képességet és a Cr(VI) bioakkumulációt is,

(ii) a csökkent GSH tartalom és a csökkent GR, GPx és kataláz specifikus enzimaktivitás az oxidatív stresszorokkal szembeni érzékenységet fokozta,

(iii) a csökkent MnSOD aktivitás alacsony intracelluláris H_2O_2 koncentrációt eredményezett, amely ismereteink szerint a Fenton típusú $\cdot OH$ gyök képzés egyik nagyon fontos eleme.

7. Összefoglalás

1. A Cr(III) hatásának vizsgálata során kimutattuk a CrCl₃ *C. albicans* élesztősejtekre gyakorolt hatásának idő és koncentráció függését, melyet alapvetően befolyásolhat a plazmamembrán összetétele. Bizonyítottuk a CrCl₃ plazmamembránra gyakorolt fluidizáló hatását és azt, hogy a barrier funkció fokozatos elvesztésével a sejtekből kiáramló, a sejtek számára létfontosságú, 260 nm-nél adszorbeáló metabolitok elvesztése eredményezi a sejtek szaporodásának leállítását, majd hosszú távon a sejtek pusztulását. A Cr(III) kation valószínűleg a plazmamembrán negatív töltésű régióiban lokalizálódik, keresztkötésű hidakat képez a foszfolipid molekulák és a negatív töltésű aminosav molekulák között a fehérjeláncoknál. Ezek a kölcsönhatások csökkentik a plazmamembránban lokalizált hidroxil csoportok stabilitását és megváltoztatják a membránproteinek körüli foszfolipid réteg elrendeződését. Ezek a molekuláris elrendeződések azok, amelyek a sejt életéhez nélkülözhetetlen, barrier funkció vesztését eredményezik, és ezen keresztül okozza a sejt szaporodás leállítását és a sejt pusztulását.
2. A kísérleteink bizonyították, hogy a *S. pombe chr-51S* szenzitív mutáns nagyobb mennyiségű Cr(V)-öt halmoz fel, ugyanolyan körülmények között, mint a vad típus, valamint, hogy ezt a Cr(V)-öt jelentősen gyorsabban redukálja, mint ahogy az a szülői *6chr⁺* törzs esetében történik.
3. Kimutattuk továbbá, hogy adaptációs folyamat nem indukálható Cr(VI) kezeléssel, a kálium-bikromáttal szemben a sejtek nem rendelkeznek adaptív sejtválással. Ez a kísérleti tapasztalat a további kutatási program igen lényeges megállapítása.
4. Bizonyítottuk, hogy a Cr(VI) szenzitív *S. pombe chr-51S* fenotípusnál a megnövekedett GR/NADPH redukció okozza a jelentős Cr(VI) felhalmozódást, bioakkumulációt, míg a megnövekedett sejtpusztulásért, a Cr(VI) szenzitivitásért a magas intracelluláris H₂O₂ koncentráció a felelős.
5. A Cr(VI) toleráns *chr1-66T* mutánsnál kimutattuk, hogy a csökkent GR specifikus aktivitás csökkent Cr(VI) redukciót és bioakkumulációt eredményez, amely alacsony intracelluláris H₂O₂ koncentrációval és Cr(VI) adás hatására csökkent •OH gyök képzési képességgel társul, amely a sejt populáció toleráns fenotípusát eredményezi.
6. Bizonyítottuk, hogy a Cr(VI) toleráns fenotípus oxidatív stressz érzékenységgel párosul, mely lehetővé tette a toleráns és a szülői törzsek egysejtszinten történő elválasztását, valamint a következő transzformációs kísérleteknél a direkt szelekciós módszer kidolgozását.

7. A króm toleráns és szenzitív mutánsok intracelluláris H_2O_2 koncentrációját figyelembe véve a Cr(VI) szenzitivitás magas, a tolerancia alacsony H_2O_2 jelenlétét eredményezi. Ugyanakkor a toleráns mutánsban a szuperoxid-gyök koncentráció megemelt szintje arra utal, hogy a Fenton-típusú reakcióban a szuperoxid gyök szerepe nem jelentős, főleg a H_2O_2 az, ami a Fenton reakción keresztül jelentősen hozzájárul a króm-érzékenységhez.
8. A Cr(V) redukálóképesség vizsgálata során megállapíthatjuk, hogy mindkét törzs redukálja a Cr(VI)-ot Cr(III)-á Cr(V)-ön keresztül, viszont a Cr(VI) toleráns mutáns Cr(V) redukciós aktivitása jóval alacsonyabb a szülői törzsnél, de a csökkenés nem olyan mértékű, mint amennyire a korábban bemutatott szenzitív mutáns redukciós képessége megnőtt. A Cr(VI) redukcióval kapcsolatos eddigi eredmények alapján azt valószínűsítjük, hogy a GSH mellett a GR/NADPH redukciós rendszer az, ami a meghatározó szerepet játssza a Cr(VI) \rightarrow Cr(III) redukciós folyamatban. Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy a Cr(VI) szenzitív törzsnél a GR specifikus aktivitás jelentős növekedése, míg a toleránsnál jelentős csökkenése támasztja alá azt a tényt, hogy a GR/NADPH enzimrendszer játszik kulcsszerepet a Cr(VI) redukcióban.
9. A szenzitív *chr-51S* mutánsban a glutation S-transzferáz enzim specifikus aktivitásában bekövetkezett majdnem kétszeres növekedés (mely enzim hatására létrejövő Cr(IV)-GSH komplexet kiürítheti a sejt az extracelluláris térbe) megmagyarázta, hogy miért nincs szignifikáns különbség a szülői és a szenzitív mutáns oxidált glutation koncentrációja között. Ezzel szemben az indukált kataláz aktivitás alacsonyabb a szenzitív mutánsban, amely arra utal, hogy a szenzitív mutáns védelmi rendszere mind a megnövekedett intracelluláris, mind a külsőleg adott oxidatív stresszel szemben csökkent mértékű, azaz kataláz enzime alulregulált.
10. A Cr(VI) tolerancia egy szignifikánsan csökkent GSH és specifikus GR aktivitással (amely enzim a NADPH mennyiségének a rovására redukálja a GSSG-t, ezáltal kulcsfontosságú antioxidáns enzim) társult, valamint ezzel párhuzamosan megnövekedett a G6PD (amely kulcsenzime a pentóz-foszfát ciklusban keletkező NADPH-nak) specifikus aktivitása. Ha ezen eredményeket összevetjük a szenzitív mutánsnál kapottakkal, ahol a GSH hasonló mértékű csökkenését tapasztaltuk, megállapíthatjuk, hogy a GR specifikus aktivitásának meghatározó szerepe van *in vitro* körülmények között a Cr(VI) redukálásában és ezt nem befolyásolja a G6PD specifikus aktivitás növekedése, ami valószínűleg NADPH túltermeléssel járt.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki professzor Pesti Miklós tanszékvezető egyetemi tanár úrnak a „Mikroorganizmusok életfolyamatainak molekuláris analízise” című mikrobiológiai programban a munka folyamán témavezetőként nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Pócsi István egyetemi docens úrnak és munkatársának Dr. Emri Tamás adjunktus úrnak (DE, TTK, Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék), hogy lehetővé tették 2 hónapos Soros ösztöndíjas programom megvalósítását és a biokémiai módszerek elsajátítását. Köszönöm Dr. Pusztahelyi Tünde egyetemi adjunktusnak a segítségével az izolált GR enzimmel folytatott kísérletek elvégzéséhez.

Köszönöm professzor Belágyi József professzor Úrnak és Farkas Nelli doktorandusznak (PTE ÁOK Központi Kutató Labor) az EPR vizsgálatokban nyújtott segítséget, köszönöm továbbá Dr. Somogyi Béla néhai intézetigazgató úrnak, Dr. Nyitrai Miklós docens úrnak és Dr. Grama László adjunktus uraknak a fluorimetriás és áramlási citometriás metodikai tanácsait.

Köszönöm a PTE TTK BI Általános és Környezeti Mirobiológiai Tanszék dolgozóinak az együttműködésüket, hasznos szakmai tanácsaikat és barátságukat, valamint Takács Krisztina, Koósz Zsuzsa és Blaskó Ágnes doktorandusz kolléganőknek a közös munkával lérehozott eredményeket, melyek a 17. és a 22. ábrákon láthatók.

Irodalomjegyzék

- Aaseth, J., Alexander, J. and Norseth, T. 1982. Uptake of ^{51}Cr -chromate by human erythrocytes-a role of glutathione. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 50: 310-315.
- Anderson, M. E. 1995. Determination of glutathione and glutathione disulphide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113: 548-555.
- Arslan, P., Beltrame, M. and Tomasi, A. 1987. Intracellular chromium reduction. *Biochim. Biophys. Acta* 931: 10-15.
- Belágyi, J., Pas, M., Raspor, P., Pesti, M. and Páli, T. 1999. Effect of hexavalent chromium on eukaryotic plasma membrane studied by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1421: 175-182.
- Baldi, F., Vaughan, A. M. and Oslon, G. J. 1990. Chromium(VI)-resistant yeast isolated from a sewage treatment plant receiving tannery wastes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 913-918.
- Beach, D., Rodgers, L. and Gould, J. 1985. *ran1+* controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Curr. Genet.* 10: 297-311.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochem. Biophys. Acta* 650: 88-127.
- Carmel-Harel, O. and Storz, G. 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 439-61.
- Carter, W. O., Narayanan, P. K. and Robinson J. P. 1994. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 55: 253-258.
- Cervantes C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Totte-Guzmán, J. C. and Moreno-Sánchez, R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Micobiol. Rev.* 25: 335-347.
- Chiu, D. T. Y., Stults, F. H. and Tappel, A. L. 1976. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 445: 558-566.
- Costa, M. 1997. Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans. *CRC Rev. Toxicol.* 27: 431-442.
- Cohen, M. D., Kargucin, B., Klein, C. B. and Costa, M. 1993. Mechanism of chromium carcinogenicity and toxicity. *CRC Rev. Toxicol.*, 23: 255-281.

- Cupo, D. Y. and Wetterhahan, K. E. 1985. Modification of chromium (VI)-induced DNA damage by glutathione and cytochrome P-450 in chick embryo hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6755-6759.
- Czakó-Vér, K., Batic, M., Raspor, P., Sipiczki, M. and Pesti, M. 1999. Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Microbiol. Lett. 178: 109-115.
- Czakó-Vér, K., Koósz, Zs., Antal, J., Rácz, T., Sipiczki, M. and Pesti, M. 2004. Characterization of chromate-sensitive and -tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. Folia Microbiol. 49: 31-36.
- Emri, T., Bartók, G. and Szentirmai, A. 1994. Regulation of specific activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum*. FEMS Microbiol. Lett. 117: 67-70.
- Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A., 1999. Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. Free Radic. Res. 30, 125-132.
- Garcia, J. D. and Jennette, K. W. 1981. Electron-transport cytochrome P-450 system is involved in the microsomal metabolism of the carcinogen chromate. J. Inorg. Biochem. 14: 281-95.
- Galiazzo, F., Carri, M.T., Ciriolo, M.R. and Rotilio, G. 1994. Superoxide dismutases in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Metal Ions in Fungi (Winkelmann, G. and Winge, D.R. Eds.) pp. 361-390. Marcel Dekker, New York.
- Gullner, G. és Kőmíves, T. 1998. A glutation szerepe növény kórokozó kölcsönhatásokban. Biokémia 22: 83-88.
- Gomes, D.S., Fragoso, L.C., Riger, C.J., Panek, A.D. and Eleutherio, E.C.A. 2002. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1573: 21-25.
- Gille, G. and Sigler, K. 1994. Effect of H₂O₂-induced oxidative stress on some yeast membrane functions. Folia Microbiol. 39: 518-9.
- Gille, G. and Sigler, K. 1995. Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol. 40: 131-152.
- Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, M. H., 1986. Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. FEBS Lett. 197: 115-120.
- Gruber, J. E. and Jennette, K. W. 1978. Metabolism of the carcinogen chromate by rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82: 700-6.

- Halliwell, B. and Gutteridge J. M. C. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press
- Henderson, L. M. and Chappell, J. B. 1993. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *European Journal of Biochemistry*. 217: 973-980.
- Howlett, N. G. and Avery, S. V., 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2971-2976.
- Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A. 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 386: 73-76.
- Jamieson, D. J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511-1527.
- Jeong, J-H., Kwon, E-S. and Roe, J-H. 2001. Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 908-914.
- Katz, S. A. and Salem, H. 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* 13: 217-224.
- Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A. and Beach, D. 1988. Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J.* 7: 1537.
- Langard, S. 1993. Role of chemical species and exposure characteristics in cancer among persons occupationally exposed to chromium compounds. *Scandinavian J. Work Environ. Health* 19: 81-89.
- Lee, J., Dawes, I. W. and Roe, J. H. 1995. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiol.* 141: 3127-3132.
- Lee, J., Dawes, I. W. and Roe, J. H., 1997. Isolation, expression, and regulation of the *pgr1*⁺ gene encoding glutathione reductase absolutely required for the growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 272: 23042-23049.
- Leonard, A. and Lauwerys, R. R. 1980. Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutation Research* 77: 227-231.
- Liobell, A., Lopey-Ruiz, A., Peinado, J. and Lopey-Barea J. 1988. Glutathione reductase mediates the stimulation of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by GSSG. *Biochem. J.* 249: 293-296.

- Liu, K. J., Shi, X., Jiang, J. J., Doda, F., Dalal, N. S. and Swartz, H. M. 1996. Low frequency electron paramagnetic resonance investigated on metabolism of chromium(VI) by whole mice. *Annu. Cin. Lab. Sci.* 26: 176-184.
- Liu, K. J., Shi, X. and Dalal, N. S. 1997. Synthesis of Cr(IV)-GSH, its identification and its free hydroxyl radical generation: a model compound for Cr(VI) carcinogenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 54-58.
- May, J. W. and Mitchison, J. M. 1986. Length growth in fission yeast cells measured by two novel techniques. *Nature* 322: 752.
- Miller, C. A., Cohen, M. D. and Costa, M. 1991. Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis-diammine-dichloroplatinum(II) and chromium compounds. *Carcinogenesis* 12: 269-276.
- Mitchison, J. M. 1970. *Methods Cell Physiol.* 4: 131-165.
- Mitchison, J. M., and Nurse, P. 1985. Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *J. Cell Sci.* 75: 357.
- Miyata, H., Miyata, M. and Johnson, B. F. 1988. Pseudo-exponential growth in length of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Can. J. Microbiol.* 34: 1338-43.
- Munz, P., Wolf, K., Kohli, J. and Leupold, 1989. Genetics overview. In *Molecular Biology of the Fission Yeast*. Academic Press.
- Murray, A. 1995. The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr. Opinion Gen. Dev.* 5: 5-11.
- Nasim, A., Young, P. and Johnson, B. F. 1989. *Molecular biology of the fission yeast*. Academic Press Inc., San Diego, California
- Ning, J. and Grant, M. H., 2000. The role of reduced glutathione and glutathione reductase in the cytotoxicity of chromium(VI) in osteoblasts. *Toxicol. Vitr.* 14: 329-335.
- Norseth, T., Alexander, J., Aaseth, J. and Langard, S. 1982. Biliary excretion of chromium in the rat: a role of glutathione. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 51: 450-455.
- Oberley, L. W. and Spitz, D. R. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105: 457-464.
- Odds, F. C. 1988. *Candida and candidosis*. 2nd ed. Bailliere Tindall, London.
- Ohsumi, Y., Kitamoto, K. and Anraku, Y. 1988. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *Journal of Bacteriology* 170: 2676-2682.
- Ono, B-I. and Weng, M. 1982. Chromium resistant mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 6: 71-77.

- Ormos, G. and Manyai, S. 1977. Chemical modification of erythrocytes. Effect on the velocity of chromate uptake. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 12: 310-315.
- Penninckx, M. J. and Elskens, M. T. 1993. Metabolism and functions of glutathione in microorganisms. *Advances in Microbial Phys.* 34: 239-301.
- Penninckx, M. J. 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 1466: 1-11.
- Pepi, M. and Baldi, F., 1992. Modulation of chromium(VI) toxicity by organic and inorganic sulfur species in yeasts from industrial wastes. *Biometals* 5: 170-185.
- Pesti, M., Campbell, J. M. and Peberdy, J. F. 1981. Alteration of ergosterol content and chitin synthase activity in *Candida albicans*. *Curr. Microbiol.* 5: 187-190.
- Pesti, M. and Ferenczy, L. 1982. Protoplast fusion of hybrids of *Candida albicans* sterol mutants differing in nystatin resistance. *J. Gen. Microbiol.* 128: 123-128; 1982
- Pesti, M., Horváth, L., Vigh, L. and Farkas, T. 1985. ESR determination of plasma membrane order parameter, lipid content and phase transition point in *Candida albicans* sterol mutants. *Acta Microbiol. Hung.* 32: 305-313.
- Pesti, M; Gazdag, Z. and Belágyi, J. 2000. In vivo interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane, as revealed by EPR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 375-380; 2000
- Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91: 86-105.
- Pinto, M. C., Mata, A. M. and López-Barea, J. 1984. Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 228: 1-12.
- Pócsi, I., Prade, R. A. and Penninckx, M. J. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microbial. Phys.* 49: 1-76.
- Rapoport, A. and Muter, O. 1995. Biosorption of hexavalent chromium by yeasts. *Proc. Biochem.* 30: 145-149.
- Rausser, W. E. 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.* 109: 1141-1149.
- Roggenkamp, R., Sahm, H. and Wagner, F. 1974. Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett.* 41: 283-286.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujilli, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M. and Freeman, B.A. 1994. Nitric-oxid regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent

- lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.*, Oct 269: 26066 - 26075.
- Rossi, N., Gorman, N. and Wetterhahn. 1988. Mitochondrial reduction of the carcinogen chromate: formation of chromium(V). *Chem. Res. Toxicol.* 1: 101-7.
- Scherer, S. and Magee, P. T. 1990. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* 54: 226-241.
- Shi, X. and Dalal, N. S. 1989. Chromium(V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase-catalyzed reduction of chromium(VI). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 163: 627-634.
- Shi, X. and Dalal, N. S. 1990a. Evidence for a Fenton-type mechanism for the generation of $\bullet\text{OH}$ radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media. *Arch. Biochem. Biophys.* 281: 90-95.
- Shi, X. and Dalal, N. S. 1990b. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 342-350.
- Shi, X. and Dalal, N. S. 1990c One-electron reduction of chromate by NADPH-dependent glutathione reductase. *J. Inorg. Biochem.* 40: 1-12.
- Shi, X. and Dalal, N. S. 1992. The role of superoxide radical in chromium(VI) generated hydroxyl radical: The Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* 292: 323-327.
- Shi, X., Chiu, A., Chen, C. T., Halliwell, B., Castranova, V. and Vallyathan V. 1999. Reduction of Cr(VI) and its relationship to carcinogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 2: 87-104.
- Snow, E. T. 1991 A possible role of chromium(III) in genotoxicity. *Environ. Health Perspect.* 92: 75-81
- Soll D. R. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 183-203.
- Standeven, A. M. and Wetterhahn, K. E. 1989. Chromium(VI) toxicity: uptake, reduction, and DNA damage. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8: 1275-1281.
- Stephen, D. W. and Jamieson, D. J. 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141: 207-12.
- Sugiyama, M., Ando, A. and Ogura, R. 1989. Effects of vitamin E, vitamin B2, and selenite on DNA single strand breaks induced by sodium chromate(V). *Cancer Lett.* 38: 1-7.

- Suzuki, Y. and Fukuda, K. 1990. Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid and glutathione with special reference to the rat lung. *Arch. Toxicol.* 64: 169-76.
- Walsh, A.R. and O'Halloran, J. 1996. Chromium speciation in tannery effluent-II. Speciation in the effluent and in a receiving estuary. *Water Research* 30: 2401-2412.
- Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C. and Mannervik, B. 1985. Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol.* 113: 499-504.
- Watson, W. H., Yang, X., Choi, Y. E., Jones, D. P. and Kehrer, J. P. 2004. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol. Sciences* 78: 3-14.
- Weghe J. G. V. and Ow, D. W. 2001. Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires hmt2⁺. *Mol. Microbiol.* 42: 29-36.
- Wiegand, H. J., Ottenweilder H. and Bolt, H. M. 1985. Fast uptake kinetics in vitro of ⁵¹Cr(VI) by red blood cells of man and rat. *Arch. Toxicol.* 57: 31-34.
- Zadzinski, R., Maszevszki, J. and Bartosz, G. 1996. Transport of glutathione S-conjugates in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biol. Int.* 5: 325-330.

Internetről elérhető adatbázisok:

<http://www.om.hu/eisz/>

<http://www.bmn.com>

<http://ccc.isitrial.com/> (Current Contents)

Angol nyelvű összefoglalás (Summary)

INTRODUCTION

Among the effects of increasing industrialization that grossly contaminates the environment is the discharge of heavy metals in effluents. Chromium compounds are some of the best- documented mutagens and carcinogens. Chromium exists in many oxidation states, of which only Cr(VI) and Cr(III) ions are stable under environmental conditions. Water containing more than 0.05 mg/l of Cr(VI) is considered to be toxic. The water-soluble chromate(VI) ion is biologically active; it can readily penetrate through biomembranes via the anion-exchange channels, but it is rapidly reduced intracellularly to the kinetically much more stable Cr(III). About 90% of cellular chromium has been demonstrated to be present as Cr(III) species. *In vitro* experiments have revealed that Cr(III) ions form many complexes with biologically relevant ligand molecules; this situation is involved in DNA crosslinking, DNA-protein cross-linking, DNA condensation and decreasing DNA replication fidelity. The reduction process itself may contribute to the mutagenicity and carcinogenicity of Cr(VI) by producing the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$).

When Cr(VI) enters a cell, it undergoes several processes: (i) reduction of Cr(VI), (ii) reaction with reactive oxygen species (ROS) that results in formation of the harmful hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), and (iii) neutralization by cellular constituents, including detoxifying enzymes and antioxidants. It is generally accepted that the cyto- and genotoxic effects of Cr(VI) compounds can be attributed to the harmful $\cdot\text{OH}$ generated in a Fenton reaction between H_2O_2 and Cr(V). The Haber-Weiss reaction between $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{Cr(VI)}$ is unlikely to play a significant role in the formation of Cr(V) and hence in the generation of $\cdot\text{OH}$.

The Cr(VI) tolerance of yeasts seems to be proportional to their ability to take up sulfate from the environment. The Cr(VI) gradient between the two sides of the cell membrane is maintained by the metabolically active cells themselves, which continuously reduce the accumulated Cr(VI) to lower oxidation states in both enzymatic processes (involving flavoenzymes) and nonenzymatic processes (glutathione (GSH), NADPH and ascorbate). Among the low molecular mass reductants, GSH is widespread in yeasts and seems to be the most important agent participating in the reduction of Cr(VI). The *in vitro* reduction of Cr(VI) by GSH generates the glutathione derived thiyl radical ($\text{GS}\cdot$) and Cr(V). Importantly, among the GSH-dependent enzymes, GR has been shown *in vitro* experiments to reduce Cr(VI) directly to Cr(V), using NADPH as co-substrate, and with the concomitant

generation of superoxide. EPR studies have demonstrated that chromium in various oxidation states, but especially Cr(V) and Cr(IV), is able to react with H₂O₂ and produce the radical $\cdot\text{OH}$ in Fenton-type reactions. This deleterious, cyto and genotoxic radical may also be generated in a Cr(VI)-mediated Haber-Weiss-type reaction, but the direct participation of O₂^{•-} in the generation of $\cdot\text{OH}$ has been questioned. It is well known that $\cdot\text{OH}$ causes very severe cell damage because there is no enzymatic protection against it. The non-enzymatic $\cdot\text{OH}$ scavengers include ascorbate, α -tocopherol and carotenoids, none of which are produced by *S. pombe* cells. This yeast probably uses GSH and phytochelatins. The GSH and free radical metabolisms of fungi are rather complex and are influenced by numerous endogenous and exogenous factors. Accordingly, characterization of both the GSH-dependent and the GSH-independent pathways of the antioxidative defence system was inevitable in this case. The first line of defence against O₂^{•-} and H₂O₂-mediated injuries includes well-characterized antioxidant enzymes, including superoxide dismutases (SODs), peroxidases and catalase, which are also key elements in the adaptation to and cross-protection against various oxidative stressors. The activity of GSH-dependent detoxification processes relying on glutathione S-transferase (GST) was recorded because this enzyme is crucial when superfluous glutathione disulfide (GSSG) is transported out of the cells to maintain a physiologically relevant GSH/GSSG redox balance.

AIMS

The aims of examining the action mechanism of chromium compounds are presented here:

- To investigate the effects and the type of effects of Cr(III) on the plasma membrane of eukaryotic yeast cells.
- To prove to what extent cell proliferation and vitality is dependent on the plasma membrane composition in the interaction between Cr(III) and the plasma membrane.
- To investigate the biophysical and biochemical background of the Cr(VI) sensitive phenotype in the *chr-51S* mutant in which more than one gene was influenced by mutagenic treatment.
- To demonstrate the molecular background and the processes of Cr(VI) tolerance in the *chr1-66T* mutant in which, it was proved, mutation occurred in one gene after mutagenic treatment.

METHODS

- The origin of the strains: The ergosterol-deficient *Candida albicans* mutant erg-2 (ATCC 44831) originated from the adenine-requiring ergosterol-producing wild-type strain 33 erg⁺ (ATCC 44829). The Cr(VI)-sensitive mutant *chr-51S* and Cr(VI)-tolerant mutant *chr1-66T* were obtained from the auxotrophic strain 6 *chr+* (strain No. 6, *lys1-131 h+*).
- Cell numbers were determined with a hemocytometer and OD values.
- The inhibitory effect of CrCl₃ on growth at different concentrations was measured in liquid MM cultures, cell numbers were determined with a hemocytometer.
- EPR spectra were recorded with an ESP 300E spectrometer (Bruker, Germany) equipped with an ER 412VT temperature regulator. The EPR spectra from the fatty acid spin label 5-SASL incorporated into the membranes were taken in the temperature range 0-40°C on both control and chromium-treated samples.
- Survival rates of cells exposed to the oxidative stressors H₂O₂, menadione (MD), *tert*-butyl hydroperoxide (*tert*-BOOH), and Cd₂⁺ were estimated by a colony-counting assay.
- The specific intracellular activities of glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD, catalase, superoxide dismutases (Cu/Zn-SOD and Mn-SOD), and the specific intracellular concentrations of glutathione (GSH) and glutathione disulphide (GSSG), were determined by using well-established colorimetric assays.
- To estimate the intracellular peroxide and superoxide levels, the indicators dihydrorhodamine 123 (DHR 123) and dihydroethidium were used, the formation of rhodamine and ethidium (ET) was quantified spectrofluorimetrically and by flow cytometry, respectively. The *in vivo* generation and reduction of Cr(V) in *S. pombe* was followed by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. The *in vivo* and *in vitro* formation of •OH was measured by using the spin trap 0.1 M N-*tert*-butyl- α -phenyl nitron (PBN).
- Data represent the mean of four independent experiments. *p* values were calculated using the Student's t-test.

RESULTS

Interaction of Cr(III) with plasma membrane

- To investigate the interaction of yeast plasma membrane with Cr(III) ions, an ergosterol-producing 33 erg⁺ strain and its ergosterol-deficient erg-2 mutant of *C. albicans* were used. The absence of ergosterol in the erg-2 mutant resulted in an increased accumulation of $\Delta 8$ sterols, a decreased fatty acid chain length, a lower proportion of unsaturated fatty acids, and an increased activity of membrane-bound chitin synthase activity in comparison with the 33 erg⁺ strain. These differences in plasma membrane lipid composition of 33 erg⁺ and erg-2 were reflected both in the phase transition of the membrane lipid extracts and in the phase transition measured on living cells. Ergosterol-producing 33 erg⁺ exhibited higher membrane fluidity in comparison with mutant erg-2.
- The inhibition of growth caused by different CrCl₃ concentrations in shaken liquid media. A given CrCl₃ concentration had a significantly larger inhibition on the ergosterol-deficient mutant erg-2 than on its parental 33 erg⁺ strain. Multiplication of both strains was blocked by 100 mM CrCl₃, but the cells remained viable at this concentration for 2 h. The viability of the cell population slowly decreased to zero by 160 h after treatment.
- Cr(III) treatment appeared to cause a loss of the barrier function of the plasma membrane, resulting in the leakage of low-molecular-mass substances from the cells. Treatment for 10 h caused a loss of metabolites absorbing at 260 nm; this loss was 40% for 33 erg⁺ and 60% for erg-2.
- Cr(III) treatment caused an increased membrane fluidity in both strains, but this was more pronounced for the erg-2 mutant. The effect of the pH on the Cr(III)-treated membrane was studied by using the erg-2 mutant. Increase of the pH of the CrCl₃ solution from 2.15 to 4.30 decreased the fluidifying effect of Cr(III) on the membrane, but the tendency of the temperature changes was not modified.

Characterization of *chr1-51S* Cr(VI)-sensitive mutant

- The time-course of the reduction of Cr(V), followed by EPR spectroscopy, indicated that the *chr-51S* cells contained 2.5 times more Cr(V) than did those of its parental strain at the beginning of the EPR measurement, and underwent a much faster reduction of Cr(VI).

- The specific intracellular GSH concentration in the Cr(VI)-sensitive *chr-51S* mutant was about half that observed in the *6 chr⁺* parental strain.
- Cells pretreated with a sublethal dose of K₂Cr₂O₇ did not show any adaptive response either. In fact, this pretreatment increased the Cr(VI) sensitivity of the cells. On the other hand, adaptation to oxidative stress generated by 0.2 mM H₂O₂ resulted in significantly increased survival rates in the presence of K₂Cr₂O₇ concentrations.
- As regards the ROS metabolisms of the strains, the superoxide levels were about 1.6-times higher in the Cr(VI)-sensitive *chr-51S* mutant, which also oxidized the DHR 123 indicator stain much faster.
- As far as the GSH-dependent and GSH-independent elements of the antioxidative defence system are concerned, significantly higher GR and GST activities were recorded in the Cr(VI)-sensitive mutant than in its parental strain. It is noteworthy that the specific activity of the major NADPH supplier G6PD was also elevated in *chr-51S* cells. In *in vitro* PBN spin trapping EPR experiments, both *S. cerevisiae* and *S. pombe* purified GRs were shown to reduce Cr(VI) to Cr(V) effectively. *In vitro* Cr(VI)/Cr(V) redox cycling giving rise to considerable quantities of [•]OH was also demonstrated in the presence of H₂O₂.
- The EPR results indicated the one-electron reduction of Cr(VI) to Cr(V) by GR isolated either *S. cerevisiae* or *S. pombe* and reoxidation of Cr(V) to Cr(VI) in the presence of H₂O₂ via HABER-WEISS reaction.
- The same specific Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, catalase and GPx activities were found in both parental and Cr(VI)-sensitive strains. Among the antioxidative enzymes, catalase was inducible by peroxides in both *6 chr⁺* and *chr-51S* cells, although the inducibility was much lower in the Cr(VI)-sensitive strain. Interestingly, the specific GPx activities did not respond to exposure to either H₂O₂ or *tert*-BOOH. Furthermore, the specific GR activities were not influenced by the addition of 0.5 mM diamide, which resulted in a 2.3-fold increase in the intracellular GSSG levels.

Characterization of *chr1-66T* Cr(VI)-tolerant mutant

- The time-course of Cr(V) formation and reduction monitored by EPR spectroscopy indicated that both strains reduced Cr(VI) to Cr(III) through Cr(V), but the elimination of Cr(V) in the Cr(VI)-tolerant *chr1-66T* mutant was much slower than in *6chr⁺* cells. The decreased reduction capacity of the Cr(VI)-tolerant mutant was also demonstrated

in vitro. In this case, disrupted cells of both strains were exposed to 2.0 mM $K_2Cr_2O_7$ for 5 min; again, a significantly lower Cr(V) concentration was detected in the *chr1-66T* mutant than in the *6chr+* strain. These experimental data supported the idea that there was a causal connection between the decreased reduction capacity of *chr1-66T* cells and their lower bioaccumulation of Cr(VI). These findings are in good accord with previous observations when the Cr(VI)-sensitive phenotype *S. pombe chr-51S* mutant was found to display an increased bioaccumulation of Cr(VI) and an accelerated reduction of Cr(V).

- The mutant *chr1-66T* was hypersensitive to the oxidative stress generated by several stressors, including H_2O_2 , menadione, *tert*-BOOH and Cd_2^+ .
- In fact, the intracellular GSH concentration found in the *chr1-66T* mutant was about half of that in the parental strain.
- Although the mutant strain possessed higher specific G6PD activity (G6PD is one of the key enzymes of the major NADPH-generating pentose phosphate pathway), the specific GR activity (which reduces GSSG at the expense of NADPH, a crucially important antioxidative enzyme) was highly reduced in *chr1-66T* cells. Since GR also reduces Cr(VI) directly to Cr(V), with the concomitant formation of superoxide, and its overproduction results in a Cr(VI)-sensitive phenotype, decreased GR activities are expected to lead to the manifestation of a Cr(VI)-tolerant and oxidative stress-sensitive phenotype, as observed with the *chr1-66T* strain.
- Besides the decreased specific GR activity, the increased oxidative stress-sensitivity of the Cr(VI)-tolerant mutant could be a consequence of the decreased mitochondrial Mn-SOD activity giving rise to high intracellular superoxide levels. *S. pombe* contains two superoxide dismutases, one in the cytosol (Cu/Zn-SOD) and the other in mitochondria (Mn-SOD). Mn-SOD encoded by *sod2*⁺ gene is a particularly important element of the antioxidative defence system, preventing the generation of superoxide in metabolically active mitochondria. The decreased disproportionation of $O_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 and O_2 by Mn-SOD most probably contributed to the increased Cr(VI) tolerance of *chr1-66T* too.

SUMMARY; PRESENTATION OF NOVEL FINDINGS

- The effects of Cr(III) ions on the cell membranes were found to depend on concentration and time, and the results were influenced by the membrane composition. The consequences of Cr(III)-induced membrane fluidity might be due to the damage to the barrier function disturbing the homeostasis of the cells and leading to cell death. It seems that the Cr(III) cation has a preferred localization in the negatively charged regions of the membrane, and tends to create bridges between the phospholipid molecules and the side-chains of the negatively charged amino acid residues. These interactions reduce the stability of the head group regions of the membrane, decrease the rotational energy barriers for spin probes, and possibly affect the bound layer of phospholipids around the membrane proteins. No marked dipolar broadening was observed in the presence of Cr(III), indicating that the magnetic interaction between the spin probes and Cr(III) ions can be neglected.
- The time-course of the reduction of Cr(VI), followed by EPR spectroscopy, indicated that the *chr-51S* cells contained 2.5 times more Cr(V) than did those of its parental strain at the beginning of the EPR measurement, and underwent a much faster reduction of Cr(VI).
- Cells pretreated with a sublethal dose of $K_2Cr_2O_7$ did not show any adaptive response.
- The Cr(VI)-sensitive phenotype of *S. pombe chr-51S* cells was a consequence of changes in the metabolic network of the yeast, including (i) a significantly increased GR/G6PD activity that accelerated the reduction $Cr(VI) \rightarrow Cr(V)$ and hence facilitated the intracellular accumulation of Cr, (ii) a reduced intracellular GSH concentration that hindered the effective elimination of $\bullet OH$ from the cells, and (iii) an underregulated catalase activity that would have been crucial to block the Fenton-type formation of $\bullet OH$.
- As far as the GSH-dependent and GSH-independent elements of the antioxidative defence system are concerned, significantly higher GR and GST activities were recorded in the Cr(VI)-sensitive mutant than in its parental strain. The catalase of the mutant was less inducible relative to that of the parental strain, which further weakened the oxidative resistance of the mutant. Catalase is basically important to decompose intracellular H_2O_2 and therefore to hinder Fenton-type processes resulting in $\bullet OH$. However, *in vivo* experiments with disrupted cells proved that in spite of

lower GSH content of the *chr-51S* mutant its increased GR and G6PD activities resulted significantly higher capacity to generate $\cdot\text{OH}$ than its parental strain in the presence of chromate and elevated intracellular peroxide concentration.

- The Cr(VI) tolerant mutant strain possessed higher specific G6PD activity, the specific GR activity was highly reduced in *chr1-66T* cells. Since GR also reduces Cr(VI) directly to Cr(V), with the concomitant formation of superoxide, and its overproduction results in a Cr(VI)-sensitive phenotype, decreased GR activities are expected to lead to the manifestation of a Cr(VI)-tolerant and oxidative stress-sensitive phenotype, as observed with the *chr1-66T* strain. Although the addition of NADPH to Cr(VI)-treated disrupted cells of *chr1-66T* resulted in a major increase in the generation of Cr(V).
- In conclusion, the majority of the data presented here can be explained in terms of a mutation affecting the one-copy GR gene itself or its transcriptional regulation, including the observed Cr(VI) tolerance and oxidative stress sensitivity. The decreased Mn-SOD activity enhanced both effects. Experiments aimed at the construction and characterization of GR overproducing transformants of *chr1-66T*, and the sequence analysis of the *chr1-66T pgr+1* gene, are the next steps in this project.