

A krómvegyületek hatásmechanizmusának vizsgálata eukarióta  
élesztő sejteken

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Gazdag Zoltán

Ph.D. program: Mikroorganizmusok életfolyamatainak molekuláris analízise

Program és témavezető:

Dr. Pesti Miklós

Pécsi Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológia Intézet

**Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék**

Pécs, 2007

## BEVEZETÉS

Az elmúlt száz évben az ipari termelés növekedésével arányosan, robbanásszerűen megnőtt a nehézfémek alkalmazása, kitermelése, és ezzel párhuzamosan –mindeközben a környezetvédelem fáziskésésben van az ipari fejlődéssel- a környezetszennyezés. A FAO adatai alapján az alábbi nehézfémek (amelyek sűrűsége  $5 \text{ g (cm}^3\text{)}^{-1}$ -rel azonos vagy nagyobb) világtermelése a 2000-es évre 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) más részüknek biológiai előnyös hatását nem ismerjük (Cd, Pb, Ag, Hg), ugyanakkor jól tudjuk, hogy az esszenciális elemek a természetes környezetben előforduló koncentrációnál magasabb mennyisége az élő sejtek, szervezetek számára stresszt 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 és gazdaságos kezeléséhez elengedhetetlen az egyes nehézfémek élő sejtre, szervezetre gyakorolt hatásmechanizmusának pontos ismerete.

Kísérleti programunk alapvető célja ezen környezetszennyező nehézfémek, kiemelten a krómvegyületek hatásmechanizmusának a vizsgálata. A króm Cr(VI) és Cr(III) oxidációs állapot fordul elő vizes oldatokban, ezért figyelmünket e két oxidációs állapotban lévő króm vegyületeknek szenteltük. Alaputatási programunkhoz modellszervezetként a *Candida albicans*t és a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztőt választottuk. A *Candida albicans* opportunista patogén kórokozó gomba, diploid, kromoszómaszáma 6-8. Modellorganizmusként azért választottuk, mert rendelkezésünkre állt egy jól jellemzett, ergoszterint nem termelő, nisztatin rezisztens mutáns *erg-2* és annak szülői törzse *33erg<sup>+</sup>*. Az *erg-2* mutáns membránjában az ergoszterin helyett zimoszterin és fekoszterin intermedierek halmozódtak fel, amelyek az ergoszterin kiesését túlkompensálták, oly módon változtatták meg a foszfolipidek és a zsírsavak arányát, hogy a mutáns membránja merevebbé vált. Ezért ezen törzsek megfeleltek azon célkitűzésünknek, hogy megvizsgáljuk a Cr(III) és a plazmamembrán kölcsönhatását. A *Schizosaccharomyces pombe* egysejtű eukarióta, haploid szervezet, kiválóan alkalmas mind a klasszikus genetikai, mind a molekuláris genetikai vizsgálatokra. Tanszékünkön a *S. pombe* auxotróf, ellentétes párosodási típusba tartozó ( $h^+$ ,  $h^-$ ) törzseiből indukált mutagenézissel (UV, nitrozoguanidin) több száz mutánst állítottak elő, melyből egy Cr(VI) szenzitívet, a *chr1-51S*-t és egy toleránst, a *chr1-66T*-t, valamint ezek

szülői törzset  $\delta chr^+$  választottuk ki a további munkákra. Korábbi mérésekből tudtuk, hogy a Cr(VI) minimális gátló koncentráció a szülői törzs esetében 225  $\mu\text{M}$ , a toleráns mutánsnál 275  $\mu\text{M}$ , míg a szenzitív mutáns esetében 125  $\mu\text{M}$  volt. Azt is tudtuk, hogy a Cr(VI) bioakkumulációja szignifikánsan alacsonyabb volt a toleráns mutánsnál, míg a szenzitív mutáns esetében szignifikánsan magasabb volt, mint a szülői törzsben.

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 aktív 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 élesztő sejteken.

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.

#### CÉLKITŰZÉSEK:

A krómvegyületek hatásmechanizmusának vizsgálatok az alábbi célkitűzéseink voltak:

1. Megvizsgáljuk az élesztősejtek plazmamembránja és a  $\text{CrCl}_3$  kölcsönhatását, a kölcsönhatás típusát.
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.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Vizsgálataink során a *Candida albicans* ergoszterin mutáns *erg-2* és annak szülői törzsét *33erg<sup>+</sup>*, valamint a *Schizosaccharomyces pombe* Cr(VI) szenzitív *chr-51S*, Cr(VI) toleráns *chr1-66T*, valamint ezek szülői törzsét *6chr<sup>+</sup>* vizsgáltuk.

A gombasejtek növekedését spektrofotometriásan és Bürker kamra alkalmazásával követtük nyomon.

A Cr(III) gátló hatását *C. albicans* törzseken Bürker-kamra segítségével határoztuk meg.

A plazmamembrán fluiditását elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópia segítségével *C. albicans* protoplastokon vizsgáltuk.

A 260 nm-en abszorbeálódó anyagok mérését spektrofotometriásan határoztuk meg.

A *S. pombe* élesztősejtek túlélési és adaptációs képességét telepszámlálással határoztuk meg.

A kataláz, glutation reduktáz (GR), glutation-S-transzferáz (GST), glutation-peroxidáz (GPx), glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD), szuperoxid-dizmutáz (SOD) specifikus enzimaktivitások, valamint az oxidált (GSSG) és redukált glutation (GSH) koncentráció mérése „rate assay” módszerekkel történt.

Az intracelluláris peroxidtartalom meghatározása dihidrorodamine-123-ből képződő fluoreszcens rodamin-123 segítségével áramlási citométer, az intracelluláris szuperoxidtartalom meghatározása pedig a dihidroetidumból képződő etidium spektrofluorimetriás mérésével történt. A sejtek Cr(VI) redukálóképességének mérése, valamint a hidroxil-gyök ( $\bullet\text{OH}$ ) koncentráció mérése EPR spektroszkópia segítségével *N-tert-butyl- $\alpha$ -phenil nitron* (PBN) segítségével történt, a mért termék a PBN-OH volt. Az izolált GR Cr(VI) redukáló képességét, valamint a reakció során keletkező  $\bullet\text{OH}$  gyök mennyiségét szintén EPR spektroszkópia segítségével mértük.

A középértékeket és azok szórásait (SD) minimum három független mérés adataiból számoltuk. A szignifikancia vizsgálatokhoz az adatok eloszlásától függően a Student-féle t-tesztet használtuk. Az eltéréseket  $P \leq 5\%$  valószínűségi szinten tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK

### A króm(III)-plazmamembrán kölcsönhatás vizsgálata.

Először is *in-vivo* kísérleti körülmények között a *33erg*<sup>+</sup> és az *erg-2* mutáns protoplasztjain elvégzett kísérletekkel meghatároztuk a törzsek rend paraméter (S) értékeit. Kísérleteink azt mutatták, hogy a fázistranzíciós érték az *erg-2* mutánsban 17°C-ra nőtt az ergoszterin termelő *33erg*<sup>+</sup> törzs 13°C-os fázistranzíciós értékéhez képest. Bizonyítva, hogy nem csak *in-vitro*, hanem *in-vivo* is megnövekedett a membrán merevsége.

Vizsgáltuk a CrCl<sub>3</sub> törzsekre gyakorolt szaporodásgátló hatását, az ergoszterin hiányos mutáns jelentősen érzékenyebbnek bizonyult minden alkalmazott krómkoncentrációval szemben. Mindkét törzsnél viszont a 100 mM-os CrCl<sub>3</sub> koncentráció megállította a sejtszaporodást.

Mivel a CrCl<sub>3</sub> 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; 4,3 és 2,15 pH értékeknél, amelynek során azt az eredményt kaptuk, hogy a pH értéke jelentősen módosítja rend paraméter értékeket.

Ezt követően megmértük a Cr(III) plazmamembránra gyakorolt hatását 0-40°C-os tartományban az *erg-2* mutánsnál. Az eredmények egyértelműen alátámasztották azt a sejtésünket, hogy a háromértékű króm kation kölcsönhatásba lép a plazmamembránnal és fluidizálja azt.

Meghatároztuk a 260 nm-nél adszorbeáló anyagok kiáramlását a sejtől 100 mM CrCl<sub>3</sub> koncentrációnál 10 óra kezelés után. Kísérleteink azt mutatták, hogy a *33erg*<sup>+</sup> törzs 40%-át, az *erg-2* mutáns pedig 60%-át veszíti el ezen létfontosságú, citoplazmában tárolt metabolitoknak. A kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy az *erg-2* mutáns fokozottabban érzékeny a CrCl<sub>3</sub> kölcsönhatásra, nagyobb mértékben veszíti el a sejtmembrán a karrier funkcióját, mint szülői törzse.

### A *chr-51S* Cr(VI) szenzitív mutáns jellemzése

Megvizsgáltuk, hogy a K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> kezelés indukál-e valamilyen adaptációs folyamatot élesztő sejteken. Az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy kálium-bikromáttal szemben a sejtek nem rendelkeznek adaptív sejtválással.

Megvizsgáltuk a törzsek Cr(V) redukáló képességét. A kísérlet egyértelműen mutatja, hogy 2,5-ször nagyobb mennyiségű Cr(V)-öt halmozott fel a *chr-51S* szenzitív mutáns a mérés

kezdetéig azonos körülmények között, valamint, hogy ezt a Cr(V)-öt jelentősen gyorsabban redukálja, mint ahogy az a szülői *6chr*<sup>+</sup> törzs esetében történik.

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. Ugyanakkor a GSH/GSSG arány szignifikáns különbséget nem mutatott, ami azt jelenti, hogy a sejt intracelluláris redox állapota egyensúlyban van. Megmértük a specifikus enzimaktivitását a GR és G6PD enzimeknek. Mind a két enzim esetében kb. kétszeres specifikus enzimaktivitás növekedést mértünk a szenzitív mutánsban a szülői törzshöz képest. Redukcióval kapcsolatos eddigi eredmények alapján azt valószínűsítjük, hogy a GSH mellett a GR/NADPH redukációs rendszer az, ami a meghatározó szerepet játssza a Cr(VI)  $\longrightarrow$  Cr(III) redukációs folyamatban.

Adaptációs előkísérletekben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és menadion (szuperoxid gyök indukáló anyag) kezelés hatására megfigyeltük, hogy az előkezelés csökkentette az ezt követő kálium-brikomát kezelés sejtpusztító hatását. 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-szorosa a szenzitív mutánsénak. 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) redukációját Cr(V)-é. Ezzel szemben, a GR + NADPH együtt jelentős Cr(V) redukációt indukál, ha ehhez az utóbbi rendszerhez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot adunk, akkor Cr(V) csökkenésével egyidőben igen jelentős  $\bullet$ OH gyök termelés következik be.

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

- Összegezve a szenzitív mutáns eredményeit: A Cr(VI) szenzitív fenotípus 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, amely serkenti az intracelluláris krómfelhalmozást,
  - (ii) a szignifikánsan csökkent GSH koncentráció, amely gátolja a hatékony  $\cdot$ OH gyök eliminációt,
  - (iii) az alulszabályozott kataláz aktivitás, amely nem teszi lehetővé a Fenton-típusú  $\cdot$ OH képzés gátlását.

#### A *chr1-66T* króm(VI) toleráns mutáns jellemzése

Megvizsgáltuk a Cr(VI) toleráns mutáns *chr1-66T* és a szülői törzs *6chr<sup>+</sup>* Cr(V) redukáló képességének időfüggését EPR spektroszkópiával. Az eredmények azt mutatták, 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. Ez a jelenség társult egy csökkent GSH és szignifikánsan csökkent specifikus GR aktivitással, valamint ezzel párhuzamosan megnövekedett a G6PD specifikus aktivitása. Ami még meglepő eredmény, hogy a MnSOD aktivitása szignifikánsan alacsonyabb, ami magyarázhatja az intracelluláris szuperoxid gyök kétszer akkora mennyiségét

Ha ezen eredményeket összevetjük a szenzitív mutánsnál kapottakkal, 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. Ezt bizonyítottuk izolált GR-al végzett kísérletekkel.

Megvizsgáltuk a törzsek ellenálló képességét oxidatív stresszorokkal és Cd<sup>2+</sup>-al szemben. A *chr1-66T* mutáns hiperszenzitívnek bizonyult az összes külsőleg adott oxidatív stresszorokkal szemben, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-al, MD-al, tBOOH-al és Cd<sup>2+</sup>-al. A 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.

EPR spektroszkóppal megvizsgáltuk a toleráns mutáns csökkent Cr(VI) redukciós kapacitását feltárt sejteken végzett *in vitro* vizsgálatokkal, amelyek az eddigiekben ismertetett *in-vivo* vizsgálatok eredményeit támasztották alá, bizonyították a toleráns mutáns alacsonyabb Cr(VI)

redukciós képességét, amely alátámasztotta azt az elméletünket, miszerint ok-okozati kapcsolat van a *chr1-66T* mutáns csökkent Cr(VI) redukciós 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) redukciós képességet mutatott.

Összefoglalva megállapítható:

A *S. pombe chr1-66T* Cr(VI) toleráns mutáns fenotípusa valószínűleg a glutation reductáz *pgr1*<sup>+</sup> génjében bekövetkezett egygénes mutáció vagy a *pap1-atf1* transzkripció útjában 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, csökkent GR, GPx és kataláz specifikus enzimaktivitás okozta az oxidatív stresszorokkal szembeni érzékenységet,
- (iii) a csökkent MnSOD aktivitás eredményezte az alacsony intracelluláris H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációt, amely ismereteink szerint a Fenton típusú <sup>•</sup>OH gyök képzés egyik nagyon fontos eleme.



## ÖSSZEFOGLALÁS, AZ ÚJ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA

- A Cr(III) hatásmechanizmusának vizsgálatával kimutattuk a CrCl<sub>3</sub> élesztősejtekre gyakorolt hatásának idő és koncentráció függését, melyet alapvetően befolyásolhat a plazmamembrán összetétele. Eredményeink alapján azt valószínűsítjük, 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 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 vesztesét eredményezi, és ezen keresztül okozza a sejtszaporodás leállítását és a sejt pusztulását.
- Bizonyítottuk a CrCl<sub>3</sub> 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.
- A kísérleteink bizonyították, hogy a *chr-51S* szenzitív mutáns 2,5-ször nagyobb mennyiségű Cr(V)-öt halmozott fel a Cr(V) redukciós mérés kezdetéig, valamint, hogy ezt a Cr(V)-öt jelentősen gyorsabban redukálja, mint ahogy az a szülői *6chr<sup>+</sup>* törzs esetében történik.
- Kimutattuk továbbá, hogy adaptációs folyamat nem indukálható Cr(VI) kezeléssel. Az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy kálium-bikromáttal szemben a sejtek nem rendelkeznek adaptív sejtválással.
- Bizonyítottuk, hogy a Cr(VI) szenzitív *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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentráció a felelős.
- A Cr(VI) toleráns *chr1-66T* mutánsnál kimutattuk, hogy a csökkent GR specifikus aktivitás csökkent Cr(VI) redukciót és bioakkumulációt eredményez, amely alacsony intracelluláris H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációval és ezzel egyidőben csökkent <sup>•</sup>OH gyök képzési képességgel társul, amely a sejtpopuláció toleráns fenotípusát eredményezi.
- 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.

- 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 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  $H_2O_2$  az, ami a Fenton reakción keresztül jelentősen hozzájárul a króm-érzékenységhez.
- A Cr(V) redukálóképesség vizsgálata során mindkét törzs redukálja a Cr(VI)-ot Cr(III)-á Cr(V)-ön keresztül, viszont a Cr(VI) toleráns mutáns Cr(V) redukációs képessége jóval alacsonyabb a szülői törzsnél, de a csökkenés mértéke nem olyan mértékű, mint amennyire a szenzitív mutáns redukációs képessége megnőtt. A Cr(VI) redukcióval kapcsolatos eddigi eredmények alapján azt valószínűsítjük, hogy a GSH mellett a GR/NADPH redukációs rendszer az, ami a meghatározó szerepet játssza a Cr(VI)  $\rightarrow$  Cr(III) redukációs folyamatban. Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy a Cr(VI) szenzitív törzsnél a GR specifikus aktivitás jelentős növekedése, míg a toleráns mutánsnál jelentős csökkenése támasztja alá azt a tényt, hogy a GR/NADPH enzimrendszer játszik kulcsszerepet a Cr(VI) redukcióban.
- 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.
- A vizsgálatok során tapasztaltuk, hogy a Cr(VI) tolerancia társult egy szignifikánsan csökkent glutation és specifikus GR aktivitással, valamint ezzel párhuzamosan megnövekedett G6PD specifikus aktivitással. Ezen eredményeket összevetve a szenzitív mutánsnál kapottakkal, 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.

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Pesti, M., **Gazdag, Z.**, Belágyi, J. (2000) *In vivo* interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane, as revealed by EPR spectroscopy. FEMS Microbiology Letters 182: 375-380. (IF: 1.615)
2. Pesti, M., **Gazdag, Z.**, Emri, T., Farkas, N., Koósz, Zs., Belágyi, J., Pócsi, I. (2002) Chromate sensitivity in fission yeast is caused by increased glutathione reductase activity and peroxide overproduction. Journal of Basic Microbiology 42: 408-419. (IF: 0.512)
3. **Gazdag, Z.**, Pócsi, I., Belágyi, J., Emri, T., Blaskó, Á., Takács, K., Pesti, M. (2003) Chromate tolerance caused by reduced hydroxyl radical production and decreased glutathione reductase activity in *Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Basic Microbiology 43: 96-103. (IF: 0.839)
4. **Gazdag, Z.**, Pesti, M. (2002) Molecular mechanisms of action of chromium compounds in yeast (a short review). Acta Microbiology et Immunology Hungaricae 49, 277-278. (IF:-)
5. Pesti, M., Pócsi, I., Emri, T., **Gazdag, Z.** (2002) Altered redox state of chromate sensitive and tolerant mutants of fission yeast. Acta Biologica Debrecina 22, 173. (IF:-)

### Egyéb közlemények

1. Poljšak, B., **Gazdag, Z.**, Jenko-Brinovec, S., Fujs, S., Pesti, M., Belagyi, J., Plesničar, S., Raspor, P. (2005) Pro-oxidative versus antioxidative properties of ascorbic acid in chromium(VI) induced damage: an in vivo and in vitro approach. Journal of Applied Toxicology 25: 535-48. (IF: 1.850)
2. Fujs, S., **Gazdag, Z.**, Poljšak, B., Stibilj, V., Milačič, R., Pesti, M., Raspor, P., Batič, M. (2005) The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. Journal of Basic Microbiology 45: 125-35. (IF: 1.000)
3. Raspor, P., Plesnicar, S., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Miklavcic, M., Lah, B., Logar-Marinsek, R., Poljšak, B. (2005) Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid). Cell Biology International 29(1), 57-63. (IF: 1,194)
4. Poljšak, B., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Jenko-Brinovec, Š., Belagyi, J., Plesničar, S., Raspor, R. (2006) Pro-oxidative vs. antioxidative reactions between Trolox and Cr(VI): the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Environmental Toxicology and Pharmacology 22: 15-19. (IF: 0,905)
5. Poljšak, B., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Filipič, M., Fujs, S., Farkas, N., Plesničar, S., Raspor, R. (2006) Role of the vitamin E model compound trolox in the prevention of Cr(VI)-induced cellular damage. Toxicological & Environmental Chemistry 88: 141-157. (IF:-)
6. Gyetvai, Á., Emri, T., Fekete, A., Varga, Zs., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Belágyi, J., Emődy, L., Pócsi, I., Lenkey, B. (2007) High-dose methylprednisolone influences the physiology and virulence of *Candida albicans* ambiguously and interferes with certain antifungal agents. FEMS Yeast Research 7:265-75. (IF: 2.477)

7. Takács, K., **Gazdag, Z.**, Raspor, P., Pesti, M. (2007) Gene expressions and enzyme analyses in the *Schizosaccharomyces pombe*  $\Delta pap1$  transcription factor mutant exposed to  $Cd^{2+}$ . Journal of Basic Microbiology 47: 87-83. (IF: 1.000)

8. Fekete, A., Emri, T., Gyetvai, Á., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Varga, Zs., Balla, J., Cserhádi, Cs., Emődy, L., Gergely, L., Pócsi, I. (2007) Development of oxidative stress tolerance resulted in decreased pathogenicity in a tert-butylhydroperoxide tolerant mutant of *Candida albicans*. FEMS Yeast Research 7: 834-47. (IF: 2,477)

9. Fekete, A., Emri, T., Pócsi, I., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Karányi, Zs., Majoros, L., Gergely, L., Pócsi, I. (2007) Increase in the oxidative stress tolerance of *Candida albicans* is disadvantageous for this opportunistic human pathogen in terms of morphological transitions and phospholipase secretion. FEMS Yeast Research (accepted) (IF: 2,477).

10. Koósz, Zs., **Gazdag, Z.**, Antal, J., Pesti, M. (2007) Characterization of chromate tolerant *Schizosaccharomyces pombe* mutant. Folia Microbiologica (accepted) (IF: 0,963)

#### **Kéziratban:**

**Gazdag, Z.**, Tóth, D., Emri, T., Fujs, S., Raspor, P., Pócsi, I. and Pesti, M. Deficiency in *bc1* complex of *Schizosaccharomyces pombe* caused Cd sensitivity and decreased activity some antioxidant enzymes.

#### **Az értekezés alapjául szolgáló konferencia absztraktok**

1. **Gazdag, Z.**, Emri, T., Pócsi, I., Böjti, G., Pesti, M. (2000) Effect of altered glutathione metabolism enzymes activities on chromate and cadmium sensitivity and tolerance of *Schizosaccharomyces pombe*. 28<sup>th</sup> Conference on Yeast Smolenice, Slovakia, p. 65.

2. **Gazdag, Z.**, Emri, T., Farkas, N., Zoltán, M., Belágyi, J., Pócsi, I., Pesti, M. (2001) Analysis of the kinetics of Cr(VI) reduction in fission yeast. 29<sup>th</sup> Annual Conference on Yeasts Smolenice, Slovakia, p. 242.

3. **Gazdag, Z.**, Emri, T., Farkas, N., Zoltán, M., Belágyi, J., Pócsi, I., Pesti, M. (2001) Kromát szenzitivitás és tolerancia vizsgálata a *Schizosaccharomyces pombe*ban. Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése Balatonfüred, Hungary, p. 53.

4. Takács, K., Blaskó, Á., **Gazdag, Z.**, Pesti, M. (2002) *Schizosaccharomyces pombe* jelátviteli mutánsainak nehézfém és oxidatív stressz érzékenysége. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi Nagygyűlése Balatonfüred, Hungary, p. 19.

5. Pesti, M., **Gazdag, Z.**, Emri, T., Belágyi, J., Pócsi, I. (2002) Increased sensitivity caused by altered glutathione reductase activity and peroxide over-production in *Schizosaccharomyces pombe*. 2<sup>nd</sup> International Fission Yeast Meeting Kyoto, Japan, p. 159.

#### **Egyéb konferencia absztraktok**

1. **Gazdag, Z.**, Bonnefoy, N., Belágyi, J., Papp, G., Pesti, M. (2002) A légzésdeficiens *Schizosaccharomyces pombe* mutáns nehézfém és oxidatív stressz érzékenysége. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi Nagygyűlése Balatonfüred, Hungary, p. 20.

2. Takács, K., Blaskó, Á., **Gazdag, Z.**, Pesti, M. (2002) *Schizosaccharomyces pombe* jelátviteli mutánsainak nehézfém és oxidatív stressz érzékenysége. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi Naggyűlése Balatonfüred, Hungary, p. 19.
3. **Gazdag, Z.**, Bonnefoy, N., Belágyi, J., Papp, G., Pesti, M. (2002) A légzésdeficiens *Schizosaccharomyces pombe* mutáns nehézfém és oxidatív stressz érzékenysége. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi Naggyűlése Balatonfüred, Hungary, p. 20.
4. Koósz, Zs., **Gazdag, Z.**, Miklós, I., Sipiczki, M., Pesti, M. (2002) *Schizosaccharomyces pombe* Cr(VI) toleráns mutáns transzformánsainak jellemzése. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi Naggyűlése Balatonfüred, Hungary, p. 20.
5. **Gazdag, Z.**, Bonnefoy, N., Belágyi, J., Papp, G., Pesti, M. (2003) Examination of alterations in glutathione defence system of respiratory-deficient *Schizosaccharomyces pombe* mutants 31th Annual Conference on Yeasts, Smolenice, Slovakia, p. 68.
6. Poljsak, B., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Farkas, N., Plesnicar, S., Raspor, P. (2003) The role of antioxidant protection against chromium(VI) toxicity on model organism *Saccharomyces cerevisiae*. 31th Annual Conference on Yeasts, Smolenice, Slovakia, p. 69.
7. Fujs, S., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Belágyi, J., Raspor, P., Batic, M. (2003) Effect of copper and zinc on reactive oxygen species generation in yeast *Candida intermedia* 31th Annual Conference on Yeasts Smolenice, Slovakia, p. 70.
8. Fujs, S., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Belágyi, J., Raspor, P., Batic, M. (2003) Generation of reactive oxygen species (ROS) in yeast *Candida intermedia* as results of copper and zinc exposure. 1<sup>st</sup> FEMS Congress Ljubljana, Slovenia, p. 305.
9. Poljsak, B., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Farkas, N., Plesnicar, S., Raspor, P. (2003) The antioxidant vitamin pretreatment improves chromium(VI) remediation ability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 1<sup>st</sup> FEMS Congress Ljubljana, Slovenia, p. 411.
10. **Gazdag, Z.**, Farkas, N., Belágyi, J., Papp, G., Rácz, T., Takács, K., Pesti, M. (2003) Altered cadmium sensitivity of respiratory-deficient *Schizosaccharomyces pombe* mutant 14<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Balatonfüred, Hungary, October 9-11,
11. Fekete, A., Emri, T., **Gazdag, Z.**, Majoros, L., Pesti, M., Pócsi, I., Gergely, L. (2003) Oxidative stress tolerance and pathogenicity of a lipide peroxide tolerant mutant of *Candida albicans* 14<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Balatonfüred, Hungary, October 9-11,
12. Poljsak, B., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., Farkas, N., Plesnicar, S., Raspor, P. (2003) The role of antioxidant vitamins on chromium(VI) induced damage EUROTOX 2003 Congress of European Societies of Toxicology Florence, Italy, p. 25.
13. Poljsak, B., **Pesti, M.**, **Gazdag, Z.**, Plesnicar, S., Raspor, P., Belágyi, J., Dergec, T., Farkas, N. (2004) *The importance of trolox in Cr(VI) mediated intracellular damage prevention*. **32nd Annual Conference on Yeast** Smolenice, Slovenia, p. 89.

14. Fekete, A., Emri, T., Gazdag, Z., Blaskó, Á., Majoros, L., Nagy, E., Balla, J., Varga, Zs., **Pesti, M.**, Pócsi I., Gergely L. (2004) *Egy lipid-peroxid toleráns Candida albicans mutáns jellemzése. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, p. 34.*
15. Koósz, Zs., Gazdag, Z., Miklós, I., Sipiczki, M., Berenténé, B. J., Komlósi, K., Havasi, V., Melegh, B., Pesti, M. (2004) *A glutation redukáz enzim és a pap1 transzkripció faktor szerepe a Cr(VI) toleranciában a Schizosaccharomyces pombe-nál. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. Évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium Keszthely, Hungary p. 61.*
16. Pesti, M., **Gazdag, Z.**, Takács, K., Czakó-Vér, K., Koósz, Zs., Antal, J., Rácz, T. (2004) *A krómvegyületek hatásmechanizmusa élesztősejteken. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. Évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium Keszthely, Hungary p. 95.*
17. Fujs, S., Batic, M., **Gazdag, Z.**, Pesti, M., and Raspor, P. (2004) The role of antioxidative defense system against various metal stresses in yeast *Candida intermedia* **Yeasts in Science and Technology the Quest for Sustainable Development** Rio de Janeiro, Brazil, 15-20<sup>th</sup> August
18. Czéh, Á., **Gazdag, Z.**, Vér, Cs., Rudolf, P., Kulik, Z., Nagy, K., Óss, M., Takács, K., Borsodi, A., Márialigeti, K., (2005) *The role of alkaliphilic bacterium species in the compost production enriched with wood ashes. 1 st Central European Forum for Microbiology (CEFORM) Keszthely, Hungary October 26-28,*
19. Pesti, M., **Gazdag, Z.**, Papp, G., Antal, J., Stromájer-Rácz, T., Koósz, Zs., Takács, K., Pócsi, I., Belágyi, J., Raspor, P. (2006) Mechanism of action of chromium compounds on *Schizosaccharomyces pombe* cells. **European Fission Yeast Meeting**, Cambridge, England, p 24.
20. Czéh, Á., **Gazdag, Z.**, Vér, Cs., Rudolf, P., Kulik, Z., Nagy, K., Óss, M., Novák, E.K., Borsodi, A.K., Márialigeti, K., Pesti, M. (2006) Application of alkaliphilic bacterium species for compost production enriched with calcium-mud. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, Hungary October 18-20, 2006. p 256