

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A citrinin mikotoxin által okozott külső és az *ERG5* gén deléciója okozta belső stressz és következményeinek vizsgálata élesztősejteken

PhD értekezés

Máté Gábor

PÉCS, 2015.

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A citrinin mikotoxin által okozott külső és az *ERG5* gén deléciója okozta belső stressz és következményeinek vizsgálata élesztősejteken

PhD értekezés

Máté Gábor

Témavezetők
Prof. Pesti Miklós DsC
egyetemi tanár

Gazdag Zoltán PhD
egyetemi adjunktus

.....
Prof. Pesti Miklós
egyetemi tanár

.....
Gazdag Zoltán PhD
egyetemi adjunktus

.....
Prof. Gábrriel Róbert
egyetemi tanár
a Biológiai Doktori
Iskola vezetője

PÉCS, 2015.

„Végtelen számú kísérlet sem bizonyíthatja, hogy igazam van, de egyetlen kísérlet is bizonyíthatja, hogy tévedtem.”
/Albert Einstein/

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke.....	5
II. Bevezetés	6
III. Irodalmi áttekintés.....	8
III.1. Az oxidatív stressz	8
III. 1.1. Oxidatív stresszorok.....	9
III.1.2. Lipid-peroxidáció	11
III.1.3. Az antioxidáns védelmi rendszer	14
III.1.3.1. Nem enzimatis védelmi rendszer.....	14
III.1.3.2. Enzimatis védelmi rendszer.....	15
III.2. A mikotoxinok	16
III.2.1. A citrinin	17
III.2.1.1. A citrinin hatásmechanizmusa.....	18
III.3. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	22
III.3.1. A <i>S. pombe</i> általános jellemzése	22
III.3.2. A <i>S. pombe</i> sejtciklusa	22
III.3.3. A <i>S. pombe</i> oxidatív stresszválaszainak molekuláris szabályozása	24
III.4. A <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
III.4.1. A <i>S. cerevisiae</i> általános jellemzése.....	26
III.4.1. A <i>S. cerevisiae</i> sejtciklusa.....	27
III.4.1. A <i>S. cerevisiae</i> szterin-bioszintézise	28
IV. Célkitűzések.....	31
V. Anyag és módszer	34
V.1. Mikroorganizmusok és fenntartásuk	34
V.2. Táptalajok, tápoldatok, pufferek	34
V.3. Szaporodás-kinetika mérése	35
V.4. A CTN citotoxicitás pH-függésének vizsgálata.....	35
V.5. Szaporodásgátlás vizsgálata	36
V.6. Pusztítási görbe felvétele.....	36
V.7. Az adaptáció vizsgálata.....	37
V.8. A CTN felvétel-kinetikájának meghatározása	37
V.9. <i>S. pombe</i> jelátviteli mutánsok tesztje	38
V.10. Intracelluláris peroxid-koncentráció mérése áramlási citométer segítségével	38
V.11. Intracelluláris szuperoxid-koncentráció mérése áramlási citométer segítségével... 38	
V.12. Intracelluláris peroxid- és szuperoxid-koncentráció mérése fluoriméterrel.....	38
V.13. Intracelluláris összes ROS-koncentráció mérése fluoriméterrel	39
V.14. Minták előkészítése hidroxilgyök- és enzimaktivitás-mérésekhez	39
V.15. Intracelluláris hidroxilgyök koncentrációjának mérése.....	39
V.16. Glutation-koncentráció és -enzimaktivitás mérések.....	40
V.16.1. GSH- és GSSG-koncentráció mérése.....	40
V.16.2. Tiol-tartalom meghatározása.....	41
V.16.3. Glutation-reduktáz specifikus enzimaktivitásának mérése.....	42
V.16.4. Glutation-peroxidáz specifikus enzimaktivitásának mérése.....	42
V.16.5. Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz specifikus enzimaktivitásának mérése 42	
V.16.6. Glutation S-transzferáz specifikus enzimaktivitásának mérése.....	43
V.16.7. Kataláz specifikus enzimaktivitásának mérése.....	43
V.16.8. Szuperoxid-dizmutázok specifikus enzimaktivitásának mérése.....	43
V.17. Fehérje-tartalom mérése.....	44

V.18. A CTN sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata	44
V.19. <i>S. pombe</i> sejtmag morfológiájának vizsgálata	45
V.20. Az <i>erg5Δ</i> mutáns antifungális szerekekkel szembeni érzékenységének vizsgálata....	45
V.21. Minták előkészítése lipid- és szterin-analízishez	45
V.22. BY4741 és <i>erg5Δ</i> törzsek szterin-analízise	46
V.23. BY4741 és <i>erg5Δ</i> törzsek zsírsav-analízise	47
V.24. Fluoreszcens anizotrópia meghatározása	48
V.25. BY4741 és <i>erg5Δ</i> törzsek glicerín-asszimilációjának vizsgálata.....	48
V.26. Statisztikai analízis.....	48
VI. Eredmények.....	49
VI.1. A CTN-nel végzett kísérletek eredményei	49
VI.1.1. <i>S. pombe</i> növekedési görbéjének felvétele	49
VI. 1.2. A CTN citotoxicitás pH-függésének vizsgálata	49
VI.1.3. Szaporodásgátlás vizsgálata.....	50
VI.1.4. Pusztítási görbe felvétele	51
VI.1.5. Adaptáció vizsgálata	51
VI.1.6. A CTN felvétel-kinetikájának meghatározása	52
VI.1.7. Intracelluláris reaktív oxigén-fajták mérése.....	53
VI.1.8. <i>S. pombe</i> jelátviteli mutánsok tesztje	53
VI.1.9. Az antioxidáns védelmi rendszer aktivitásának vizsgálata	54
VI.1.10. A CTN sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	55
VI.1.11. <i>S. pombe</i> sejtmag morfológiájának vizsgálata	56
VI.2. A <i>t</i>-BuOOH-val végzett kísérletek eredményei	57
VI.2.1. Az <i>erg5Δ</i> mutáns antifungális szerekekkel szembeni érzékenységének vizsgálata..	57
VI.2.2. Szaporodásgátlás vizsgálata.....	57
VI.2.3. Pusztítási görbe felvétele	58
VI.2.4. BY4741 és <i>erg5Δ</i> törzsek szterin-analízise	59
VI.2.5. BY4741 és <i>erg5Δ</i> törzsek zsírsav-analízise	60
VI.2.6. Fluoreszcens anizotrópia meghatározása	64
VI.2.7. BY4741 és <i>erg5Δ</i> törzsek glicerín-asszimilációjának vizsgálata.....	65
VI.2.8. Intracelluláris reaktív oxigén-fajták mérése.....	65
VI.2.9. Az antioxidáns védelmi rendszer aktivitásának vizsgálata	66
VII. Eredmények megvitatása.....	68
VII.1. A CTN pH-függő citotoxikus hatásának vizsgálata és a CTN felvétel-kinetikája .	68
VII.2. A CTN oxidatív stressz-indukáló hatása és következményeinek vizsgálata	69
VII.3. Az <i>ERG5</i> gén mutációjának hatása a plazmamembránnal összefüggő folyamatokra	74
VII.4. Az <i>erg5Δ</i> mutáns redox-homeosztázisának vizsgálata.....	75
VII.5. A <i>t</i> -BuOOH kezelés plazmamembrán összetételére és a sejtek redox- állapotára gyakorolt hatásának vizsgálata	76
VIII. Összefoglalás.....	79
IX. Summary.....	82
X. Melléklet	85
XI. Köszönetnyilvánítás	86
XII. Irodalomjegyzék	87
XIII. Publikációs lista.....	99

I. Rövidítések jegyzéke

<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Caco-2	humán epiteliális kolorektális adenokarcinóma sejt kultúra
CAT	kataláz
CTN	citrinin
DCF	2'7' diklorofluorescein
DCFDA	2'7'-diklorofluorescein diacetát
DHE	dihidroetidin
DHR123	dihidrorodamin 123
EPR	elektron paramágneses rezonancia
FFAs	szabad zsírsavak
G6PD	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GR	glutation-reduktáz
GPx	glutation-peroxidáz
GSH	glutation
GSSG	glutation-diszulfid
GST	glutation S-transzferáz
HepG2	hepatocelluláris karcinóma sejt kultúra
Hsp	hősokkfehérje
MAPK	mitogén-aktivált protein-kináz
MIC	minimális gátló koncentráció
PLFAs	poláris lipidek zsírsavai
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsavak
ROS	reaktív oxigén származékok
SFA	telített zsírsavak
SOD	szuperoxid-dizmutáz
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -butil-hidroperoxid
TAGFAs	triacil-glicerol zsírsavak
O ₂ ^{•-}	szuperoxid gyök
•OH	hidroxilgyök
USFA	telítetlen zsírsavak
Vero	afrikai zöldmajom vese sejt kultúra

II. Bevezetés

Az élőlények, különös tekintettel a vizsgálatunk tárgyát képező egysejtű élesztők [*Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)], stresszhatásoknak vannak kitéve, amelyekre adott gyors alkalmazkodási válasz, reakció az adott élőlény, a faj fennmaradásának a feltétele. A környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodóképesség révén a sejtek kialakítottak egy optimális, dinamikus belső egyensúlyt, amit homeosztázisnak nevezünk (Cannon, 1926). A homeosztázist megszüntető hatást stressznek nevezzük, amit a stressz erősségétől függően a sejtek, az evolúció során kialakult adaptációs folyamatok révén kompenzálni tudnak. Az adaptáció különféle jelátviteli útvonalak közreműködésével valósul meg. Élesztősejtekben a legfontosabb stresszválaszt közvetítő jelátviteli útvonal a mitogén-aktivált protein-kináz rendszer (MAPK), amelynek foszforilációja aktiválja a redox szenzitív transzkripciós faktorokat és a sejt e faktorok közvetítésére megváltoztatja a génexpressziós profilját oly módon, hogy bekövetkezzen pl. a reaktív oxigén származékoknak (ROS) az inaktivációja az antioxidáns enzimek és az antioxidáns hatású molekulák termelése révén (Ikner és Shiozaki, 2005; Halliwell és Gutteridge, 2007; Papadakis és Workman, 2014; Vivancos és mtsai., 2006). Ha a stresszhatás olyan erős, hogy a sejt adaptációs mechanizmusa nem képes szabályozni a hatásokat, akkor a sejtek pusztulását eredményező apoptotikus illetve nekrotikus sejthalál következik be (Takeda és mtsai., 2010).

A stresszt két nagy csoportra különíthetjük el eredetét tekintve: a redox homeosztázis, mint egyensúly, megváltozhat (i) külső hatásokra (pl.: oxidatív stresszorok, xenobiotikumok, mikotoxinok, átmeneti fémek, stb. hatására), illetve (ii) belső genetikai módosulás által (pl. mutáció, kromoszómaszám változás, stb.), melyek egyaránt oxidoredukciós változást okozhatnak. Disszertációmban mind a külső stressz, mind pedig a belső stressz modellezésére egy kísérleti rendszert állítottunk be, amelyekhez a petite-negatív, haploid hasadó élesztő *S. pombe*-t, illetve a petite-pozitív, haploid sarjadzó élesztő *S. cerevisiae*-t használtuk.

Külső stresszfaktor hatására bekövetkező redox állapot változásra számos példa ismert: (i) a kadmium glutation- (GSH) kimerülést okoz, ami különféle ROS-ok, mint pl.: szuperoxid gyök ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilgyök ($\bullet OH$), peroxidok, stb. felhalmozódását eredményezi (Liu és mtsai., 2009); (ii) a króm kation szintén GSH-kimerülést és $\bullet OH$ koncentráció növekedését okoz (Pesti és mtsai., 2002). A fenti két példa mellett számos oxidatív stresszort ismerünk; ezen belül vizsgáltuk a citrinin (CTN) mikotoxin hatásmechanizmusát, valamint azokat a folyamatokat, amelyek a *S. pombe* sejtek oxidatív stressz állapotához vezetnek.

A belső oxidatív stressz vizsgálatára egy véletlenszerű megfigyelés adott lehetőséget. Előkísérleteink alapján, *S. cerevisiae* azon deléciós mutánsai, amelyek az ergoszterin és membrán foszfolipid szintézisben sérültek, a szülői törzshöz képest eltérő érzékenységet mutattak oxidatív stresszorokra. Ez egy újszerű megfigyelés, mivel a mutáció okozta oxidatív stressz napjainkban alig ismeretes. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy milyen folyamatok játszódnak le egy lipid-peroxid által okozott kezelés hatására, jellemeztük az oxidatív stressz állapotot és kerestük a választ, hogy a mutáció, jelen esetben az *ERG5* gén deléciója hogyan okozhat megváltozott redox állapotot a törzsben.

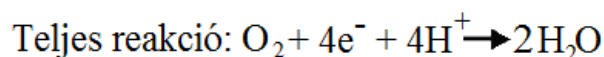
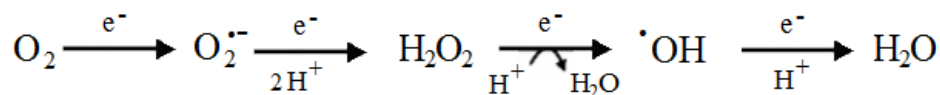
Ezen folyamatok megismerése, a regulációs rendszerekbe való betekintés, az oxidatív stressz következményeinek vizsgálata elvezethet bennünket egy olyan ismerethez, ami az élőlények védelmét, egészségét szolgáló intézkedésekhez (pl.: mikotoxinok megengedhető koncentrációjának meghatározása élelmiszerekben) vezethet, vagy a mutáció okozta oxidatív stressz esetén az oxidatív stresszel kapcsolatos betegségek (Alzheimer-kór, diabétesz, Parkinson-kór, stb.) megértésében és gyógyításában segítséget nyújthat (Hwang, 2013; Perry és mtsai., 2002). A legújabb kutatások kimutatták, hogy a humán betegségekkel kapcsolatos gének több mint 20%-ával ortológ gének az élesztőgombákban is megtalálhatóak (pl.: metabolikus betegségek génjei: elsősorban mitokondriális betegségek; dermatológiai betegségek génjei, gasztrointesztinális betegségek génjei, stb.) (Barrientos, 2003; Forslund és mtsai., 2011), aminek köszönhetően az egysejtű eukarióta élesztőkön végzett kutatások segíthetik a magasabbrendű állati szervezetekben lejátszódó folyamatok hatékonyabb, gyorsabb megismerését.

III. Irodalmi áttekintés

III.1. Az oxidatív stressz

Stressz alatt értünk minden olyan fizikai, biológiai és kémiai hatást, mely az élő szervezetre nézve káros, ártalmas, s ez által megváltoztatja annak életfolyamatait. A stressznek különböző megnyilvánulásai lehetnek. A stressz-folyamatok lehetnek: hőstressz, fénystressz, oxidatív stressz, stb. Oxidatív stresszfolyamatokról akkor beszélhetünk, ha a szervezeten belül felborul a ROS-ok, valamint az őket kordában tartó antioxidáns folyamatoknak az egyensúlya, aminek háttérében vagy az egyes antioxidánsok szintézisének gátlása, vagy a ROS-ok túlzott akkumulációja, vagy esetleg mindkettő állhat.

A szabadgyököket úgy definiálhatjuk, mint reaktív molekulákat, amelyek egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek a külső elektronhéjukon, melynek következtében hajlamosak elektront elvonni más molekuláktól. Ide sorolható az egy párosítatlan elektront tartalmazó hidrogénatom, több átmeneti fém és maga az oxigénmolekula is. Az oxigénmolekula két párosítatlan, azonos spinű elektronnal rendelkezik, alapállapotban nem mondható reaktívnek, mivel csak olyan molekuláktól tud elektront elvonni, amelyek két párosítatlan, antiparalel helyzetű elektronnal rendelkeznek. A mitokondriális légzés során azonban az elektron-transzport rendszer számos olyan redox központot tartalmaz, ahonnan elektron szivároghat az oxigénre, melynek következtében az oxigén nem teljes (négyelektronos) redukciója során az oxigénnek mintegy 1%-a szuperoxid gyökké ($O_2^{\bullet-}$) alakul (1. ábra). Ez az antioxidáns védelmi rendszer megfelelő működése esetén hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) dizmutálódik, továbbá a $O_2^{\bullet-}$ és a H_2O_2 vizes közegben való limitált reakciókészségének ellenére igen reaktív hidroxilgyök ($\bullet OH$) is keletkezhet. Az oxigénből származtatható gyököket és a nem gyökös intermediereket ROS-oknak nevezzük (Gille és Sigler, 1995; Halliwell és Gutteridge, 2007; Scandalios, 2005; Turrens, 2003).



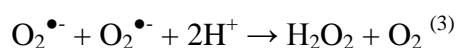
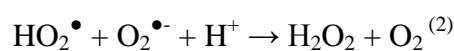
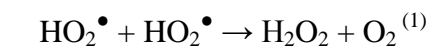
1. ábra. Az oxigén teljes és nem teljes redukciója (Scandalios, 2005 alapján).

III.1.1. Oxidatív stresszorok

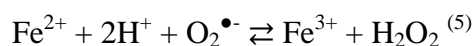
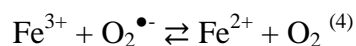
Szuperoxid gyök

A legfontosabb *in vivo* $O_2^{\bullet-}$ forrás a mitokondriális elektron-transzport rendszer, ahol elsősorban a NADH-ubikinon-reduktáz komplexből, illetve magából a redukált ubikinonból szivároghat elektron az oxigénmolekulára. Másik jelentős $O_2^{\bullet-}$ forrás az endoplazmatikus retikulum. Ennek membránjában helyezkedik el egy citokróm P450 típusú enzim, amely egy monooxygenáz, és xenobiotikumok, illetve a sejt saját szubsztátjainak (zsírsavak, szteroidok) hidroxilálásában vesz részt. A folyamat során egy flavoprotein enzim a NADPH-citokróm-P450-reduktáz elektront szolgáltat a citokróm P450-nek NADPH+H⁺-ből. Mind a reduktáz redukált formája, mind a citokróm oxidált formája a szivárgó elektron forrása lehet. Egyéb források lehetnek még a sejtmag membránjának NADH- és NADPH-fogyasztó elektron-transzport rendszere, a fagocita sejtek membránkötött NADPH-oxidáza, illetve a növények kloroplasztizánának I-es fotorendszere, valamint a levelek peroxiszómájának xantin-oxidáza (Gille és Sigler, 1995).

A $O_2^{\bullet-}$ egy erősen reaktív gyök, azonban a reaktivitása erősen függ a közegétől. Relatív magas reaktivitással rendelkezik hidrofób környezetben, míg hidrofil körülmények között alacsony a reaktivitása. Szerves oldatban a $O_2^{\bullet-}$ erős bázis, míg vizes oldatban mind redukáló, mind pedig gyenge oxidáló tulajdonságokkal is rendelkezik. Utóbbi esetben gyenge savakkal konjugátumokat képezhet, ilyen pl. a hidroperoxil gyök (protonált $O_2^{\bullet-}$, HO_2^{\bullet}), mely diszproporció során három lépésben H_2O_2 -á alakul.



A $O_2^{\bullet-}$ képes átmeneti fémeket, mint pl. a vas redukálni, illetve oxidálni:



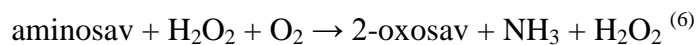
Redukáló tulajdonságának köszönhetően redukálja a légzési láncban a citokróm c-t, gyenge oxidáló tulajdonsága miatt pedig oxidálja a polifenolokat, a tokoferolt, az aszkorbátot és tiolokat (pl. cisztein); továbbá inaktiválni képes a kataláz (CAT) nevű antioxidáns enzimet is. Mindezen túl, redukáló tulajdonságának köszönhetően képes a fehérjék Fe-S klasztereit tönkretenni [a Fe(III) redukálásán keresztül]. A felszabaduló vas további károsodásokat okozhat (pl.: a Fenton-reakció révén). Továbbá az így képződő redukált vasat a sejtek nem

képesek újrahasznosítani, vashiány lép fel, illetve a Fe-S klaszter újra szintézise is zavart szenved (Halliwell és Gutteridge, 2007).

Mint láthattuk, vizes közegben való korlátolt reaktivitása ellenére egyéb oxidáló ágenseknek (H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$) is forrása lehet, ezért a sejteknek érdekükben áll, hogy minél gyorsabban eliminálják, mely folyamatban a szuperoxid-dizmutázok (SOD) játszanak meghatározó szerepet (Gille és Sigler, 1995, Halliwell és Gutteridge, 2007).

Hidrogén-peroxid

Ahogy a $\text{O}_2^{\bullet-}$ bemutatásánál említettük, minden rendszer ami termel $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t, a diszproporciós reakció következtében egyaránt termel H_2O_2 -t is. Ez az átalakulás bekövetkezhet nem enzimatis módon a diszproporció révén, illetve enzimatisan a SOD-ok által. További jelentős H_2O_2 forrás az eukarióta sejtek peroxiszómája. Az aminosavak aminosav-oxidázok révén való deaminálása, illetve a glükóz glükóz-oxidáz révén való δ -glükonolaktonná oxidálása miatt a peroxiszómák jelentős H_2O_2 forrásnak számítanak (Gille és Sigler, 1995).



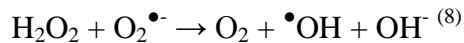
Akár csak a $\text{O}_2^{\bullet-}$, a H_2O_2 is szolgálhat mind oxidáló, mind pedig redukáló ágensként és reaktivitása is erősen limitált vizes közegben. Azonban a $\text{O}_2^{\bullet-}$ -dal szemben, képes átpenetrálni csaknem az összes biológiai membránon (mivel nem rendelkezik töltéssel), ezáltal a keletkezés helyétől távolabb is indukálhat oxidatív károsodásokat (Saran és Bors, 1991). A biológiai rendszerek számos komponensével képes adduktot létrehozni, az így keletkező hidrogén-kötött kelátok, H_2O_2 -karrierek pedig még inkább megnövelik a diffúziós távolságot. Az egyik leghatékonyabb addukt-formáló a hisztidin. Az L-hisztidin kapcsán kimutatták, hogy képes nyolcszorosára növelni a H_2O_2 -indukálta kromoszóma aberrációkat (Oya és Yamamoto, 1988). A H_2O_2 képes a fehérjék cisztein és metionin oldalláncainak károsítására. Hatására pl. a cisztein oldalláncokon szulfenil csoport (SO^-), szulfonil csoport (SO_2^-), illetve szulfonil csoport (SO_3^-) jelenhet meg, a metioninból pedig metionin-szulfoxid keletkezhet (Halliwell és Gutteridge, 2007). Mindezek mellett az oxidatív stressz vonatkozásában, a H_2O_2 jelentősége a rendkívül reaktív $\bullet\text{OH}$ képzésében rejlik.

Semlegesítése a CAT (melyet a *ctt1*⁺ gén kódolja), illetve glutation-peroxidáz (GPx) enzimek segítségével történik. Egy órán keresztül, 0,2 mM H_2O_2 -val kezelt *S. pombe* sejtekben a CAT aktivitásban 2,8-szoros, míg a GPx aktivitásban kétszeres emelkedést figyeltek meg (Lee és mtsai., 1995). Quinn és mtsai. (2002) Northern-blot analízissel

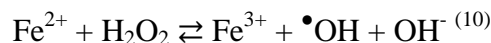
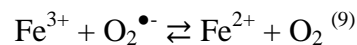
kimutatták, hogy már 15 perccel a 0,25 mM-os H₂O₂ kezelést követően megemelkedett a *S. pombe ctt1*⁺ mRNS szintje.

Hidroxilgyök

Ahogy már fentebb említésre került, mind a O₂^{•-}, mind a H₂O₂ reaktivitása relatív alacsony. Éppen ezért, az általuk okozott sejtkárosodások túlnyomó része •OH képző képességükből fakad. Haber és Weiss (1934) már a 20. század első felében kimutatták, hogy a O₂^{•-} és a H₂O₂ reakciója direkt módon •OH képződéséhez vezet.



Úgy tartották, hogy a Haber-Weiss-reakció a •OH fő forrása a biológiai rendszerekben. Később azonban kimutatták, hogy vizes közegben alacsony a képződés esélye ($k < 1$, ahol a k reakciósebességi állandó leírja, hogy bizonyos időegység alatt a reakcióban a kiindulási anyagmennyiség mekkora koncentrációban alakul át), hacsak nincs a rendszerben nagy mennyiségű átmeneti fém (pl. vas vagy réz). A reakciót később Fenton-reakciónak nevezték el (Halliwell és Gutteridge, 1984).

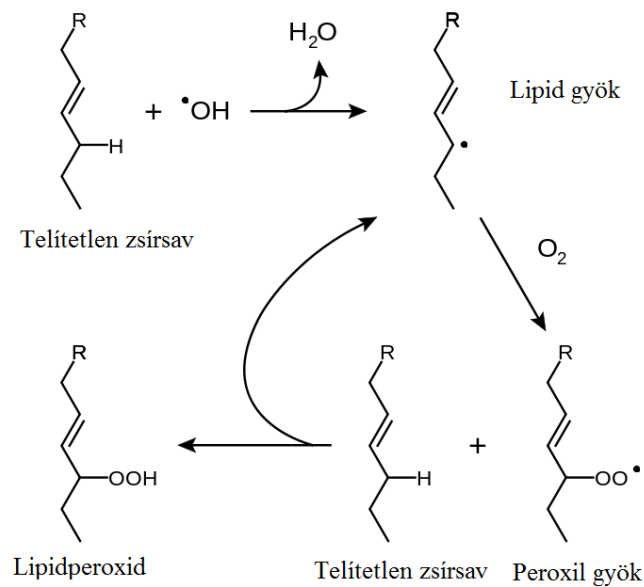


A •OH a legreaktívabb ismert ROS, a sejtek bármely molekulájával képes reagálni és a lipid-peroxidációs láncreakció egyik fő kiváltója (Gille és Sigler, 1995). Enzimatisz védelem nem létezik ellene, így keletkezésének kivédésével csökkenthető a mennyisége, ami elsősorban a vas-metabolizmus szigorú kontrollja révén valósul meg. Kisebb mennyiségben a glutation (GSH) –SH csoportja révén is képes semlegesíteni (Wang és Ballatori, 1998).

III.1.2. Lipid-peroxidáció

A lipid-peroxidáció a telítetlen lipidek oxidatív károsodása. Elsősorban a többszörösen telítetlen zsírsavakat (PUFAs) érinti, de kisebb eséllyel az egyszeresen telítetlen (MUFAs) vagy akár a telített zsírsavak (SFAs), és a membrán ergoszterinje/koleszterinje is oxidálódhatnak. A folyamat elindításáért elsősorban a szabadgyökök felelősek (elsősorban a •OH, mivel a O₂^{•-} csak csatornákon tud a biológiai membránokon keresztül menni), azonban a lipidperoxidáció a ciklooxigenázok, a lipoxigenázok vagy a citokróm P450 monooxigenázok révén a foszfolipid-ciklus természetes folyamataként enzimatisz úton is végbemehet (Siddiqui és mtsai., 2008). A szabadgyökök egyrészt a telítetlen kötés felszakításával képesek hozzákapcsolódni a zsírsavakhoz, másrészt pedig hidrogénatomot képesek elvonni a metilén-csoportról, létrehozva egy lipid gyököt. A keletkezett lipid gyök reakcióba lép

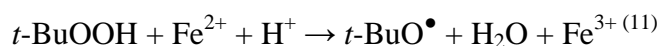
oxigénmolekulával és peroxil gyök keletkezik. Ekkor beindul egy lánreakció szerű folyamat (2. ábra): a peroxil gyök hidrogént von el egy másik zsírsavtól, újabb lipid gyököt létrehozva, ő maga pedig lipid-peroxiddá (lipid-hidroperoxid) alakul (Girotti, 2008; Halliwell és Chirico, 1993; Halliwell és Gutteridge, 2007). Bár a lipid-hidroperoxid nem gyökös molekula, kiindulásul szolgálhat egyéb reaktív gyökök (pl.: peroxil gyök vagy epoxil-allil-peroxil gyök) keletkezéséhez (Wang és mtsai., 2006).



2. ábra. A lipidperoxidáció folyamata (1. weboldal alapján).

A membránokat alkotó lipidek amfipatikus tulajdonságúak, tartalmaznak egy poláris feji részt, illetve egy hidrofób farok részt. A lipid-peroxidáció hatására a farki rész hidrofóbítása növekszik, aminek köszönhetően sérülhetnek a membránok biológiai funkciói, (pl.: transzport-folyamatok, respiráció, sejtfal-szintézis) valamint megnövekszik a permeabilitása (Howlett és Avery, 1997).

A *tert*-butil-hidroperoxid (*t*-BuOOH) egy organikus lipid-hidroperoxid analóg, amely külsőleg alkalmazott prooxidánsként lipid-peroxidációt indukál, ezáltal alkalmas a folyamat tanulmányozására. Intraperitoniális injekcióval kezelt hím patkányokban a szérum malondialdehid [MDA, a lipid-peroxidációs folyamat egyik végterméke, amely pl. tiobarbitursav felhasználásával, a TBARS teszt segítségével kvantifikálható (Simić és mtsai., 2007)] szintje 62%-kal megemelkedett (Oh és mtsai., 2012); továbbá *t*-BuOOH-kezelt élesztő sejtekben a lipid-peroxidáció generálta diének mennyisége szignifikánsabb megnövekedett a kontrollhoz viszonyítva (Fekete és mtsai., 2007; Krasowska és mtsai., 2002). A *t*-BuOOH toxicitásának hátterében a butoxyl gyök képzése áll egy Fenton-típusú reakción keresztül (Halliwell és Gutteridge, 1999; Girotti, 2008).



Kálmán és mtsai. (2013) *S. pombe* szülői (*hyd*⁺) és *t*-BuOOH rezisztens (*hyd1-190*) törzseit vizsgálva, a megnövekedett fázistranzíciós hőmérséklet alapján megnövekedett plazmamembrán rigiditást tapasztalt a rezisztens törzs esetében. Ennek hátterében nem USFA/SFA, PUFA/SFA arányának csökkenése állt, hanem a rezisztens törzs szterinmintázatának megváltozása, azaz a membránban a zimoszterin, az ergoszterin, a fekoszterin, az ergoszta-5,7-dienol, és az episzterin mennyiségének növekedése a szülői törzshöz viszonyítva. Mindkét törzset kezelve 1 órán keresztül 0,2 mM *t*-BuOOH-val ellentétes hatást tapasztaltak. A *t*-BuOOH a szülői *hyd*⁺ törzsben rigidizáló, míg a mutánsban fluidizáló hatást fejtett ki, melynek hátterében a szterin-, illetve zsírsavösszetétel ellentétes változása állt.

Oxidatív stresszorról lévén szó, a *t*-BuOOH szignifikáns változásokat indukál az antioxidáns enzimek és -molekulák aktivitásában. Patkány májból izolált mitokondriumokon, 4 perces, 24 nM mg fehérje⁻¹ *t*-BuOOH hatására a GSSG tartalom 36,8-szeresére emelkedett (Liu és Kehrer, 1996). *Hansenula mrakii*-t a kései exponenciális fázisig 2 mM *t*-BuOOH-val kezelve a CAT aktivitás lecsökkent, a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) aktivitás pedig megemelkedett. A SOD aktivitásában, illetve a GSH-tartalomban nem tapasztaltak változást (Tran és mtsai., 1995). A *t*-BuOOH rezisztens *Candida albicans* (*C. albicans*) sejtekben megemelkedett GSH-tartalmat, valamint glutation-reduktáz (GR), G6PD-, és GPx aktivitást tapasztaltak (Fekete és mtsai., 2008). Megnövekedett specifikus GPx és GR aktivitást, valamint GSH csökkenést és GSSG-tartalom emelkedést tapasztaltak *t*-BuOOH kezelt *Penicillium chrysogenum* sejteken (Emri és mtsai., 1997). Az indukált oxidatív stressz következtében egyszálú DNS töréseket figyeltek meg humán epiteliális kolorektális adenokarcinóma sejt kultúrán (Caco-2) már 30 perces szubinhibitorikus kezelés hatására (Aherne és O'Brien, 2000).

Más, lipid-peroxidációt indukáló molekulánál, a 4-hidroxi-2-nonenal-nál (HNE) kimutatták, hogy patkány máj epiteliális RL34 sejt kultúrát kezelve GSH depléciót és a peroxidok akkumulációját indukálja, illetve up-regulálja a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) útvonalat (Uchida és mtsai., 1999). Ugyancsak GSH csökkenésről számoltak be Wonisch és mtsai. (1997) HNE IC₅₀-es koncentrációjával (50% pusztulást okozó koncentráció) kezelt *S. cerevisiae* sejteken. Kumén-hidroperoxid nem letális koncentrációjának hatását vizsgálva *S. pombe* *sod1Δ* és *gsh1Δ* mutáns sejteken, megnövekedett érzékenységet tapasztaltak. A kezelés hatására a *ctt1*⁺ (CAT) gén nem up-regulálódott, helyette a *gpx1*⁺ (GPx) aktivitása nőtt meg (Mutoh és mtsai., 2005.). Szubletális

koncentrációjú linolsav-hidroperoxiddal kezelt *S. cerevisiae* microarray analízise alapján a detoxifikációért felelős gének overexpresszálódnak (*SOD1*, *GPX2*, *CTT1*, *HSP12*, *HSP26*, *HSP30*), a fehérjeszintézis génjei viszont represszálódnak (Alic és mtsai., 2004).

III.1.3. Az antioxidáns védelmi rendszer

A ROS-ok számos káros hatás kifejtésére képesek a biológiai rendszereken, ezért az aerob légkör létrejötte az élőlények evolúciója során egy antioxidáns védelmi rendszer létrejöttét eredményezte a ROS hatásainak kivédésére és megelőzésére. Az antioxidánsok úgy definiálhatók, mint bármely olyan anyag, amely direkt módon megköti a ROS-okat, indirekt módon aktiválja az antioxidáns védelmet, vagy gátolja a ROS-ok termelődését. Az antioxidáns rendszer két fő csoportra osztható: (i) enzimatis és (ii) nem enzimatis antioxidánsokra (Carocho és Ferreira, 2013).

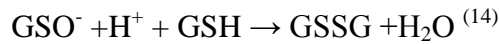
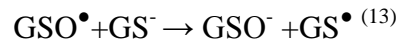
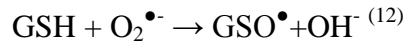
III.1.3.1. Nem enzimatis védelmi rendszer

A nem enzimatis védelmi rendszer további nagy csoportokra osztható úgy, mint vitaminokra (aszorbinsav, α -tokoferol, stb.), enzim kofaktorokra (Q10), nitrogén vegyületekre (húgysav), karotinoidokra (β -karotin, lutein), ásványi anyagokra (cink, szelén) és peptidekre (GSH).

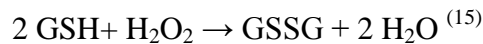
A GSH egy tripeptid molekula (L- γ -glutamil-L-ciszteinil-glicin), amely az oxidatív stresszel szemben védi a sejteket azáltal, hogy vagy hidrogénatomot, vagy elektront ad át. Antioxidáns kapacitását a $-SH$ csoportjának köszönheti, ahol a kénatom könnyen alkalmazkodni tud az elektron elvesztéséhez. Vízoldhatóságának köszönhetően megtalálható a citoszólban, a mitokondriumokban, a sejtmagban, a mennyisége akár 10 mM-os koncentrációt is elérhet. A sejtben megtalálható mind redukált (GSH), mind pedig oxidált (GSSG, glutation diszulfid) formában. A két forma aránya (GSH/GSSG) jó mérőszáma az oxidatív stresszfolyamatoknak. Számos detoxifikáló enzim számára szolgál kofaktorként (pl.: a GPx), részt vesz a plazmamembránon keresztüli aminosav-transzportban, képes regenerálni a C- és E-vitaminokat, továbbá direkt módon gyökfogyója a $\bullet OH$ -nek, illetve a szinglet oxigénnek (Gille és Sigler, 1995; Rahman, 2007). Az oxidatív stresszfolyamatokban betöltött szerepét jelzi, hogy *gsh1 Δ* (γ -glutamil-cisztein szintáz) és *gsh2 Δ* (glutation szintáz) mutánsok fokozott érzékenységet mutattak H_2O_2 -val és $O_2\bullet$ -vel szemben, illetve a lipidperoxidáció mértéke 3-4-szeres emelkedést mutatott (Espindola és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2001). Rendkívül „univerzális” antioxidáns molekulának nevezhetjük, mert csaknem az összes ROS-sal képes

kölcsönhatásba lépni, illetve a reaktív nitrogén szabadgyököket (RNS) is semlegesíti nitrozoglutation keletkezése mellett (Pompella és mtsai., 2003).

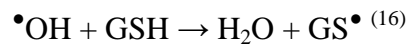
Három lépésben képes a $O_2^{\bullet-}$ semlegesítésére (Schrammel és mtsai., 2003):



GPx közreműködésével képes a H_2O_2 semlegesítésére (Forman és mtsai., 2009; Martin és Teismann, 2009; Pompella és mtsai., 2003; Valko és mtsai., 2003):



Képes a Fenton-reakcióban képződő $^{\bullet}OH$ semlegesítésére (Wang és Ballatori, 1998):



Eliminálni képes a lipidperoxidációs termékeket (Carmel-Harel és Storz, 2000):

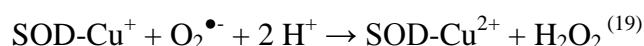
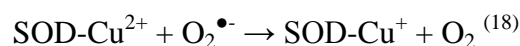


Képes konjugátumok kialakítására fémekkel, ezáltal részt vesz a fém-háztartás szabályozásában is (Wang és Ballatori, 1998).

A GSH és GSSG közti egyensúly fenntartása a GSH homesztázisért felelős enzimek feladata, melyek a következő, enzimatikus védelmi rendszer alfejezetben kerülnek bemutatásra.

III.1.3.2. Enzimatikus védelmi rendszer

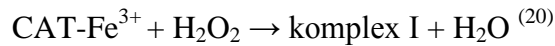
A $O_2^{\bullet-}$ semlegesítése megtörténhet a GSH által (12. reakcióképlet), illetve a SOD-ok révén, melyeknek három képviselőjét különböztetjük meg (SOD_{CuZn} , SOD_{Mn} , SOD_{Fe}), nevüket az aktív helyben található fémionról kapták. A SOD_{CuZn} megtalálható az összes eukarióta sejt citoplazmájában, néhány prokariótában, valamint a növényi peroxiszómákban. A SOD_{Mn} a prokariótákban lelhető fel, valamint az eukarióták mitokondriumában, illetve a kloroplasztisz mátrixában. A SOD_{Fe} , hasonlóan a SOD_{Mn} -hoz elsősorban prokariótákra jellemző, illetve fellelhető néhány növényben. A $O_2^{\bullet-}$ semlegesítése az aktív helyen található átmeneti fém ciklikus oxidációjával és redukciójával történik (Gille és Sigler, 1995; Rahman, 2007):



A keletkező H_2O_2 enzimatikus úton a CAT segítségével semlegesítődik. Vas tartalmú enzim, amely a peroxiszómákban (CTA1) helyezkedik el és a zsírsavak β -oxidációjakor keletkező H_2O_2 -t eliminálja. *S. cerevisiae* esetén a citoszólban is található CAT (CTT1), amelynek

egyelőre kevésbé tisztázott a pontos funkciója. A CAT génben sérült Cta1p és Ctt1p mutánsok fokozott érzékenységet mutatnak H₂O₂-vel szemben (Jamieson, 1998).

Az egyik legaktívabb antioxidáns enzim, mivel percenként mintegy 6 millió H₂O₂ molekulát képes vízzé, illetve oxigénné alakítani (Rahman, 2007).



A GSH homeosztázis fenntartásáért felelős enzimek a GPx, a GR, a glutation-S-transzferáz (GST) és a G6PD. A GPx a peroxidok (H₂O₂ és szerves peroxidok) semlegesítésében játszik szerepet, GSH kofaktor közreműködésével (15. és 17. reakcióképlet). A folyamat termékeként keletkező GSSG oxidált SH-csoportjait a GR NADPH felhasználásával regenerálja, a keletkező NADP⁺ visszaalakítását pedig a G6PD végzi a pentóz-foszfát út felhasználásával. Ha a rendszer nem győzi a GSSG regenerálását GSH-vá, akkor a GSSG-t a GST eltávolítja a sejtől, ugyanis ennek nagyobb mennyiségű felhalmozódása citotoxikus hatásokat jelent a sejt számára. A GST a GSH-xenobiotikum konjugátumok létrehozásában vesz részt (Armstrong, 1994).

III.2. A mikotoxinok

A mikroorganizmusok életfolyamataik során különféle anyagcsere-termékek előállítására képesek. Annak alapján, hogy a metabolit bioszintézise kapcsolódik-e a sejt energiatermeléséhez megkülönböztetünk elsődleges és másodlagos anyagcsere-termékeket. Az elsődleges anyagcsere-termékek esszenciálisak a sejt növekedéséhez, szaporodásához, felépítő folyamataihoz. Ezzel szemben a másodlagos metabolitok nem esszenciálisak és általában nem is termelődnek, csak bizonyos kedvezőtlen környezeti tényező hatására indul be szintézisük, mint pl. tápanyaghiány és a legtöbb esetben ez a stacioner fázisra tehető. A fonalas gombák másodlagos anyagcsere-termékei közé sorolhatjuk a mikotoxinokat, melyek az emberi és állati szervezetre nézve ártalmasak, egészségkárosító hatásúak, mezőgazdasági kártételük miatt pedig nagy gazdasági jelentőséggel rendelkeznek. Termelésük szempontjából az *Ascomycota* fajok a legjelentősebbek (elsősorban: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*; kisebb jelentőségűek: *Alternaria*, *Claviceps*, *Stachybotrys* fajok) (Bennett és Klich, 2003). Az egyes mikotoxinokra több elfogadott kategorizálási rendszer is létezik (termelő szervezet, szintézis útvonal, célszerv, stb. szerint), melyekből kiemelendő az oxidatív stressz-indukáló hatásuk alapján történő csoportosítás. Golli-Bennour és Bacha (2001) a mikotoxinokat oxidáló, mérsékelten oxidáló és nem oxidáló csoportokba osztotta. Az erősen oxidáló mikotoxinok a zearalenon (ZEA) és a citrinin (CTN). A mérsékelten oxidáló mikotoxin

csoport részét képezi a T2 toxin, az aflatoxin és a fumonizin, míg a nem oxidálók közé az ochratoxin és a deoxinivalenol sorolhatók.

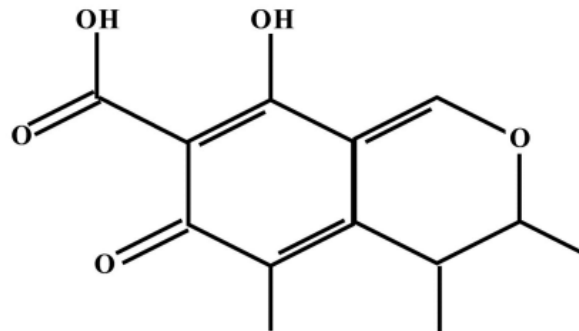
III.2.1. A citrinin

A CTN-t (3. ábra) először 1931-ben izolálta a *Penicillium citrinum*-ból Hetherington és Raistrick (Golli és mtsai., 2006; Gupta, 2007). A *Penicillium citrinum* mellett további termelői lehetnek egyéb *Penicillium* fajok (pl. *P. expansum*, *P. verrucosum*), *Aspergillus* fajok (pl. *A. terreus*, *A. niveus*, *A. oryzae*), valamint *Monascus* fajok (pl. *M. ruber*) is (Xu és mtsai., 2006; Zaied és mtsai., 2012). A termények közül a CTN elsősorban gabonafélék (pl. kukorica, búza, rizs, árpa, zab és rozs) károsítója (Flajs és Peraica, 2009), emellett azonban kimutatható még a dióból és földimogyoróból, napraforgó magból, szárított gyümölcsökből, az almaléből és sajtól is (Ribeiro és mtsai., 1997).

A CTN ($C_{13}H_{14}O_5$, (3R,4S)-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-4,6-dihidro-3H-izokromén-7-karbonsav) egy benzopirén származék, citromsárga színű, savas kémhatású, kristályos anyag, amely metanolban oldva maximális UV abszorpciót mutat 250 és 333 nm-en (Cram, 1950; Xu és mtsai., 2006). Moláris tömege $250,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Kémiai szerkezetét tekintve kinon-metid, két intramolekuláris hidrogénkötéssel. Rendezetlen struktúrában kristályosodik, folyékony állapotban a két tautomer formája, a p-kinon és az o-kinon egyenlő arányban van jelen. Vízben alig oldódik, de jó oldószere a híg nátrium-hidroxid, nátrium-karbonát vagy nátrium-acetát, a metanol, az acetonitril, az etanol és sok más poláris szerves oldószer. Magas hőmérséklet hatására, valamint kelátképzésre alkalmas savas és alkalikus oldószerekben bomlik (Xu és mtsai., 2006). Hőmérséklet hatására történő bomlásához magas, $175 \text{ }^\circ\text{C}$ körüli, száraz hőre van szükség. Nedves hővel, $140 \text{ }^\circ\text{C}$ -on történő kezelés hatására a CTN a H₁ és H₂ nevű bomlástermékére, derivatívjaira bomlik, melyek közül a H₁ még toxikusabbnak bizonyult, mint maga a CTN (Flajs és Peraica, 2009; Lu és mtsai., 2008). Ezen túl Clark és munkatársai (2006) leírták egy másik bomlástermékét is, amely egy CTN dimer, a dicitrinin A. Magasabbrendű szervezeteken belül a toxin biotranszformáció megy keresztül a teljes hatás eléréséhez: a kiválasztó szervrendszerben dihydrocitrininné alakul (Ammar és mtsai., 2000).

Kezdetben, az 1940-es években a CTN-t antibiotikumként alkalmazták Indiában, Notalin néven, azóta azonban bebizonyosodott nefrotoxikus hatása (Xu és mtsai., 2006; Zaied és mtsai., 2012). Hatásos antibiotikumnak bizonyult Gram-pozitív baktériumokkal (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*) és néhány gombával szemben

(elsősorban élesztők és fonalasok), míg a Gram-negatív baktériumok esetén nem volt kimutatható hatása (Haraguchi és mtsai., 1987; Martin és mtsai., 1986).



3. ábra. A CTN szerkezeti képlete (p-kinon) (Iwahashi és mtsai., 2007).

III.2.1.1. A citrinin hatásmechanizmusa

A toxin hatásmechanizmusának tárgyalásához két fogalom tisztázása szükséges. Ezek az akut és krónikus toxicitás fogalma. Az akut toxicitási tesztek során általában egyszeri, rövid idejű expozíciót követő gyors lefolyásról és egyértelmű toxikus tünetekről beszélhetünk. Ezzel szemben a krónikus toxicitás során, a többszöri, alacsony dózisú behatás következtében a betegség kialakulása, az elváltozások észlelhetősége (pl. daganatos elváltozások) hosszú időt ölel fel (Bennett és Klich, 2003). Ennek következtében a krónikus kezelések után egy komplex regulációs rendszer végeredményét látjuk, hiszen a behatásnak több generáción keresztül (sejtkultúrák esetén) fenn kell állnia, hogy pl. membrán-összetétel szintjén változásokat tapasztaljunk; ezzel szemben az akut kezelések során a direkt hatásokat vizsgálhatjuk.

A CTN hatása magasabbrendű eukarióta szervezetekre

Magasabbrendű állati szervezeteken (pulyka, kutya, sertés, patkány) vizsgálva a CTN hatásait, elsősorban nefrotoxikus tüneteket figyeltek meg, melyeket a vese proximális tubulusainak károsításán keresztül fejt ki (Flajs és Peraica, 2009, Krejci és mtsai., 1996). Hím egereket etetve 200 mg/kg CTN-nel 70 héten keresztül a vesén fiziológiás elváltozásokat figyeltek meg, azon adenómák keletkeztek, a toxikus hatás előrehaladtával pedig a sejtek lézióját okozta (Flajs és Peraica, 2009). A vesén keletkező fiziológiás elváltozások következményeként funkcionális zavarok tapasztalhatóak, mint például megnövekedett glükóz- és fehérje-kiválasztás; csökkent a foszfor kiválasztása, illetve csökkent a vesén

áthaladó vér mennyisége (Krejci és mtsai., 1996). Patkányokon a szubkrónikus orális kezelés vesekárosodást okozott, amelynek tünetei a megnagyobbodott vese, a kefeszegély elvesztése és a piknotikus sejtmagok (Flajs és Peraica, 2009). 50 μM CTN-nel (LD_{50}) kezelt (24-72 óra) zebraahal disztális kanyarulat csatornája ép maradt, míg a proximális kanyarulat csatornában léziók keletkeztek (Wu és mtsai., 2012). A természetben a CTN legtöbb esetben az ochratoxin A nevű mikotoxinnal fordul elő, és a két toxin által okozott hatás is elsősorban a vesét érinti. A két toxin együttes eredményeként alakulhat ki a Balkán endemikus nefropátia nevű betegség. Kimutatták, hogy az ochratoxin A toxicitását a CTN additív és szinergista módon is növelheti (Gupta, 2007; Stefanović, 1998). A toxikus hatás célszerve nem kizárólag a vese, hanem befolyással lehet a gasztrointesztinális traktusra, a csontvelőre és a májra is (Ammar és mtsai., 2000; Chan, 2007; Flajs és Peraica, 2009; Yu és mtsai., 2006). Hepatotoxikus hatásait a máj glikogén-, koleszterin- és triglicerid szintézisének gátlásán keresztül fejt ki (Sabater-Vilar és mtsai., 1999).

A CTN sejtszintű hatásai

A CTN teljes toxikus hatásának kifejtéséhez savas pH-t igényel. [*S. cerevisiae* petite mutánsokban a vakuoláris ATPáz gátlása miatt a citoszol H^+ gradiense magasabb volt, ami miatt a CTN hatása felerősödött: a gátló koncentráció 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -ről 33 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -re csökkent (Ammar és mtsai., 2000)]. A sejtekbe való bejutása, felvétel-kinetikája is erősen függ a közeg pH-jától. *S. cerevisiae* sejteken végzett kísérletek során, fél órás kezelés hatására pH 3,5-ön 10%-os felvétel tapasztalható, melynek 80%-a már az első öt percben felvételre került. Ezzel szemben pH 4,5-ön a kezdeti felvétel lassabb volt, csupán 25%-a a pH 3,5-ön kapott értéknek. 5,3-as pH-n pedig csak igen gyenge felvétel volt tapasztalható (Haraguchi és mtsai., 1987). Hogy a toxin bekerülhessen a sejtekbe, először át kell jusson a plazmamembránon. A CTN egy lipofil organikus anion, ami feltételezi annak a lehetőségét, hogy anion csatornákon keresztül történik a felvétele. Probeneciddel, egy anioncsatorna blokkolóval előkezelve vesekéreg metszeteket, a két órás toxinos kezelést követően a sejtek CTN akkumulációja csökkenést mutatott. A metszetek akkumulációját a környezet oxigéntartalma is erősen befolyásolta, tehát valószínű, hogy a toxin a sejt plazmamembránján aktív transzporttal jut át, ioncsatornák közvetítésével (Berndt, 1983). Az anioncsatornákon keresztül történő mozgás mellett egy másik elmélet szerint, mivel lipofil vegyületről beszélünk, szabadon képes átdiffundálni a membránokon (Chagas és mtsai., 1995). Több esetben írtak le membránstruktúra változásokat. Liu és munkatársai (2012) 36 órás kezelést követően a Leydig-sejtek plazmamembránján foszfatidil-szerin áthelyeződést figyelt meg a membrán

belső oldaláról a külsőre (apoptózis marker). Endo és Kuroda (1976) 18 órás, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CTN kezelés hatására 50%-os gátlást tapasztalt a *S. cerevisiae* ergoszterin bioszintézisében. A szerkezeti átrendeződés mellett károsítja is a plazmamembránt. Ezt igazolja, hogy 7 napos expozíció után *Eremothecium ashbyi*-n riboflavin és pigment szivárgás volt megfigyelhető a micéliumból (Betina és Baráthova, 1968), illetve 0,1 mM CTN-nel kezelve *S. cerevisiae* sejteket pH 3,5-en kevesebb, mint egy órán keresztül, fenol-szulfidrilsav pozitív anyagok sejtől való kismértékű szivárgását tapasztalták (Haraguchi és mtsai., 1987). A szterinbioszintézis (ergoszterin/koleszterin/tesztoszteron) gátlása hormonális zavarokhoz is hozzájárul, aminek következtében fejlődési rendellenességek lépnek fel. Egereket intraperitoniális injekcióval kezelve napi egyszer, egy hétig a szérumban mért tesztoszteron koncentrációja szignifikáns csökkenést mutatott, illetve koncentráció-függő emelkedés volt tapasztalható az abnormális spermiumok számában (Qingqing és mtsai., 2012). Blaskó és mtsai. (2013) koncentráció-függő fluidizációt figyeltek meg *S. pombe* CTN-nel kezelt tenyészetén. Ennek háttérében a CTN és a GSH molekula szabad -SH csoportjai között, valamint az integráns membránfehérjék szabad -SH csoportjai között kialakuló gyenge kölcsönhatás áll. A membrán dezorganizációjának következtében esszenciális K^+ kiáramlást figyeltek meg.

A felvételt követően a CTN a mitokondriumban akkumulálódik (a felvett CTN 46,1%-a megtalálható volt az élesztő sejtek mitokondriumaiban) és interferál a légzési lánc I. komplexével (koenzim Q-hoz kapcsolódik). Ez többek között abban is megnyilvánult, hogy a mitokondriális szukcinát-oxidáz aktivitás 48%-kal, a NADH-oxidáz 90%-kal, a citokróm-c-reduktáz 45%-kal, a NADH-dehidrogenáz 82%-kal, a citokróm-c-oxidáz 32%-kal, a malát-és glutamát-dehidrogenáz 80 és 82%-kal, illetve az ATPáz aktivitás 63%kal csökkent (Chagas és mtsai., 1992a,b; Haraguchi és mtsai., 1987). Az elektron-transzport rendszer felborításával csökkent a légzési aktivitást (Dönmez- Altuntas és mtsai. 2007; Iwahashi és mtsai. 2007; Sabater-Vilar és mtsai., 1999). A légzési lánc és ionháztartás felborulása, valamint az intracelluláris ATP-tartalom csökkenése a mitokondrium diszfunkciójához vezet, emiatt pedig csökken a sejtek életképessége (Riberio és mtsai., 1997). A mitokondriális elektron-transzport gátlásának következtében elektron szivároghat oxigénre, ezáltal $\text{O}_2^{\bullet-}$ termelődik és oxidatív stresszfolyamatokat indukál. Azonban totál ROS emelkedést csak hepatokarcinóma HepG2 sejtekben figyeltek meg 60 perces, 10-30 μM -os CTN kezelést követően (Chen és Chan, 2009); illetve egér bőrp reparátumon, 50 μM CTN-nel 12-72 órán keresztül kezelve (Kumar és mtsai., 2011). Az egyes ROS fajtákról nem áll rendelkezésünkre információ. Az intracelluláris ROS-ok megemelkedése gyakran vonja maga után a központi antioxidáns molekula (GSH)

mennyiségének csökkenését (Halliwell és Gutteridge, 1999). Ennek háttérében többek között állhatnak GPx által katalizált, GSH-fogyasztó folyamatok, illetve lehetséges interakciós mechanizmusok a toxin és a GSH között, ahogy ezt már a patulin (PAT) mikotoxin esetében is kimutatták (Fliege és Metzler, 1999). Hosszú idejű (> 72 óra) akut és krónikus kezelésekben csökkent GSH szintet tapasztaltak alveoláris epitél A540 sejtvonalon, amellyel párhuzamosan a sejtek csökkent életképességét tapasztalták (Johannessen és mtsai., 2007). Ugyancsak csökkenést tapasztaltak a 2 napig 20 mg kg⁻¹ CTN-nel orálisan kezelt patkány, vese, máj és vérplazma GSH-jában (Flajs és mtsai., 2010). Ezzel szemben rövid idejű (120 perces) akut tesztben, *S. cerevisiae*-ből származó microarray adatok alapján, melyet 300 µg ml⁻¹ CTN-nel (szubinhibitorikus koncentráció) kezeltek, aktiválódik a GSH bioszintetikus útvonal (Iwahashi és mtsai., 2007).

A CTN molekuláris interakciója az integráns membránfehérjék szabad -SH csoportjaival a plazmamembrán koncentráció-függő fluidizációját okozzák a fehérjék 3D struktúrájának megváltoztatása által, ami esszenciális összetevők szivárgásához vezethet úgy, mint 260 nm-en abszorbeáló molekulák vagy K⁺ (Blaskó és mtsai., 2013; Horváth és mtsai., 2010).

A GSH csökkenés okozta megváltozott oxido-redukciós állapotot általában az antioxidáns enzimek aktivációja kíséri (Halliwell és Gutteridge, 1999). Azonban nem állt rendelkezésünkre információ, amely alátámasztaná, hogy a megemelkedett ROS koncentrációhoz a sejt adaptálódni tudna a szignáltranszdukciós mintázatának megváltoztatásán keresztül és csak néhány publikáció foglalkozott CTN-kezelt sejtek antioxidáns enzimeinek up- vagy down-regulációjával. 12-72 órás akut tesztekben, szignifikánsan lecsökkent az egér bőrsejtek (kezelve 50 vagy 100 µg CTN-nel) CAT és GPx specifikus aktivitása, de az élő sejtek számát nem határozták meg (Kumar és mtsai., 2011). 1000µM CTN kezelés semmilyen hatással nem volt a SOD, CAT, GPx, G6PD tisztított enzimekre, de a GR specifikus aktivitása szignifikánsan lecsökkent (Riberio és mtsai., 1997). CTN expozíció hatására több oxidatív stressz-marker szintje megváltozott úgy, mint a hősokk-protein Hsp70-nek (Golli-Bennour és Bacha, 2011); majom vese Vero sejtjeiben DNS fragmentációt, illetve kromoszóma aberrációkat tapasztaltak (Bouslimi és mtsai., 2008); PK15 és limfocita sejtekben mikronukleuszok jelentek meg (Dönmez-Altuntas és mtsai., 2007; Klaric és mtsai., 2007); megfigyelték a sejtciklus blokkját (Chang és mtsai., 2011; Kumar és mtsai., 2011); és ezek a folyamatok apoptotikus sejthalálhoz vezettek (Chan, 2007; Kumar és mtsai., 2011). Az apoptózis jeleként leírták CTN-nel kezelt sejteken a kaszpáz 9, a kaszpáz 3, a p53 és a p21 megnövekedett aktivitását; az antiapoptotikus Bcl-2 expressziója lecsökkent,

amivel párhuzamosan up-regulálódott a proapoptotikus Bax (Chan, 2007; Kumar és mtsai., 2011). További markerek voltak a mitokondriális membránpotenciál elvesztése, valamint a citokróm-c citoszolba kikerülése (Chan, 2007; Chen és mtsai., 2009; Yu és mtsai., 2006).

III.3. A *Schizosaccharomyces pombe*

III.3.1. A *S. pombe* általános jellemzése

A *S. pombe*-t 1893-ban izolálta Paul Lindner egy kelet-afrikai sörből, amelyről később a nevét is kapta (*pombe*). Az 1950-es évekig mintegy feledésbe merült, amikor Urs Leupold megkezdte vele genetikai tanulmányait, illetve Murdoch Mitchinson a sejtciklus vizsgálatát. Az utóbbi munka folytatásaként, Lee Hartwell, Tim Hunt és Paul Nurse 2001-ben Nobel-díjat kapott. 2002-ben a Sanger Institute közzétette a *S. pombe* teljes genomjának szekvencia analízisét (Forsburg, 2005).

A *S. pombe* egy egysejtű, haploid, petite-negatív eukarióta modellszervezet. Pálcika alakú, átlagos keresztmetszete 3-4 μm , hosszúsága 7-14 μm . A genomja kb. 14,1 millió bázispár (három kromoszómán oszlik meg: 5,7 Mb, 4,6 Mb, 3,5 Mb), amely 4970 fehérjét kódoló génből áll (a gének mintegy 40%-ka intronokkal megszakított), legalább 450 nem kódoló RNS-ből, illetve a több kópiában is megtalálható, kb. 20 Kb méretű mitokondriális genomból. Rendszertani besorolását tekintve az *Ascomycota* törzsbe, az *Archiascomyces* osztályba, a *Schizosaccharomycetales* rendbe, és a *Schizosaccharomycetaceae* családba tartozik.

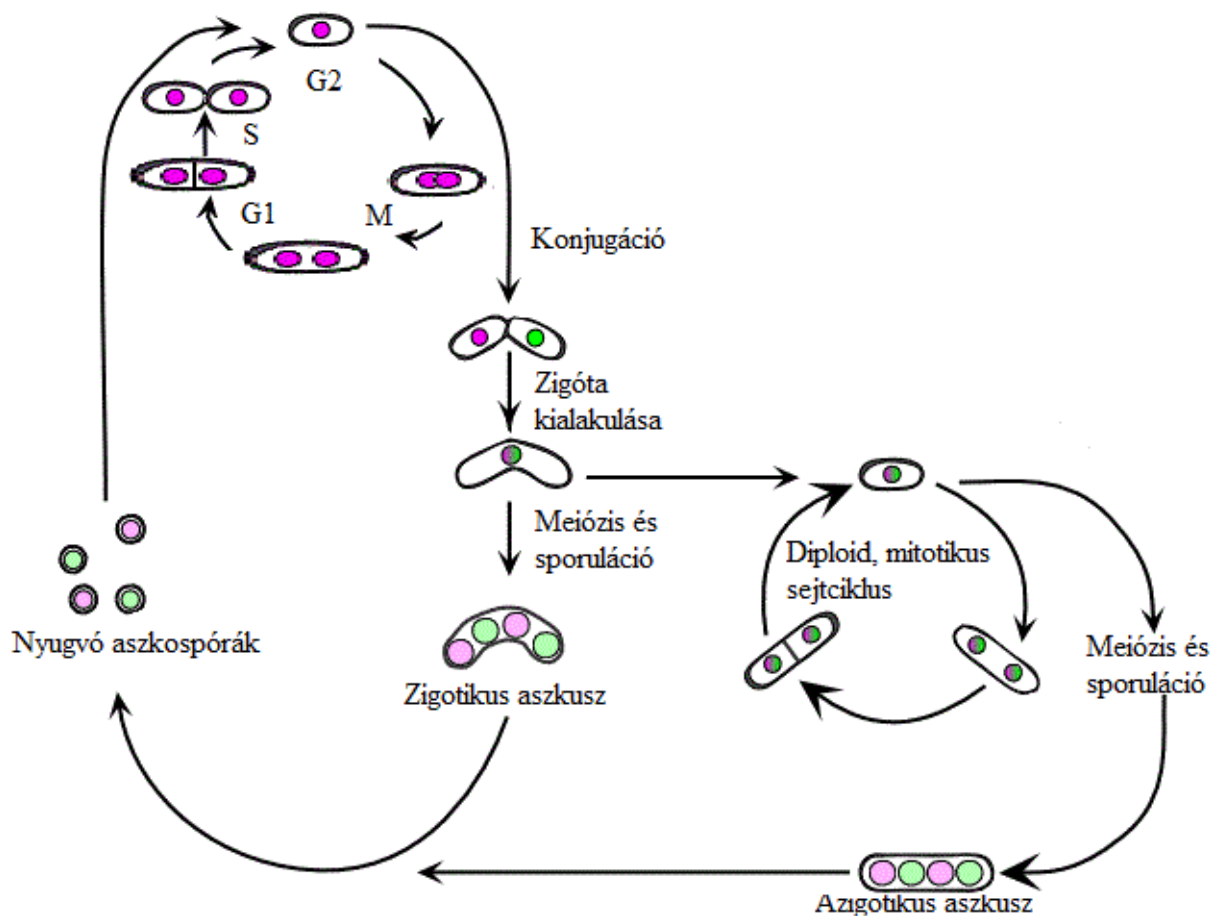
III.3.2. A *S. pombe* sejtciklusa

A *S. pombe*-nál megkülönböztetünk heterotallikus törzseket, ahol a kétféle párosodási típus (h^+ és h^-) stabil, illetve homotallikus törzseket (h^{90}), ahol az eltérő párosodási típusú törzsek átalakulhatnak egymásba.

Normál tápanyag-ellátottság mellett ivartalan, vegetatív módon, mitózissal szaporodik. Vegetatív sejtciklusa két fő szakaszra osztható: az M-fázisra és az interfázisra. Az M-fázis során zajlik a mitotikus sejtosztódás (pro-, prometa-, meta-, ana-, telofázis) és a citokinézis. Az ezt követő három szakaszt (G1, S, G2) együttesen interfázisnak nevezzük. Az S-fázisban történik a DNS megkettőződése, valamint a replikációhoz szükséges apparátus szintézise és transzportja is (úgy, mint a hisztonok szintézise, transzportja a sejtmagba, vagy a DNS-polimeráz sejtmagba történő lokalizációja az S-fázis kezdetén). *S. pombe* esetén az S-fázis kitüntetett jelentőségű, mivel a citokinézis nem történik meg az M-fázisban, hanem ez a folyamat a szeptum képzés miatt az S-fázisba tolódik át. A két úgynevezett gap fázis (G1, G2)

lényeges a ciklus szabályozásának szempontjából. Ezen szakaszok alatt lehetősége nyílik a sejtnak a külső és belső körülmények monitorozására, biztosítva, hogy az előkészületek befejeződtek, a megfelelő komponensek mennyisége elegendő legyen a következő fázisok lezajlásához. *S. pombe*-ban a G1-fázis lerövidült. Ennek oka, hogy a sejtek ebben a fázisban haploidok, ami miatt a sejt fokozottan érzékeny a mutagén hatásokra. Annak érdekében, hogy a sejtek elérjék a sejtosztódáshoz szükséges méretet, a G2-fázis hossza nagymértékben megnőtt (nagyfokú méretbeli növekedésnek kell lezajlania). A sejtciklus kb. 70%-át a G2, 10-10%-ot pedig a többi fázis teszi ki (Gómez és Forsburg, 2004). A sejtosztódás végén, az S-fázisban a sejtek középvonalában végbemegy a szeptum képzés, és a sejtek hasadással kettéosztódnak (4. ábra).

Az ivaros szaporodás során az eltérő párosodási típusú, haploid sejtek konjugálnak egymással. A kopulációt követően megtörténik a plazmogámia, majd pedig a kariogámia, és kialakul a diploid zigóta. Az esetek nagy részében a zigóta aszkusszá alakul, meiózissal négy aszkospóra keletkezik, majd az érett spórák kiszabadulnak. Az aszkuszt ilyenkor zigotikus aszkusznak nevezzük. Mesterséges körülmények között a zigóta mitózissal osztódik, létrehozva a diploid vegetatív sejteket, amelyek meiózissal tovább osztódnak. Ebben az esetben azigotikus aszkuszciklusról beszélünk (4. ábra).



4. ábra. A *S. pombe* sejtciklusa (2. weboldal alapján; Gómez és Forsburg, 2004 alapján)

III.3.3. A *S. pombe* oxidatív stresszválaszainak molekuláris szabályozása

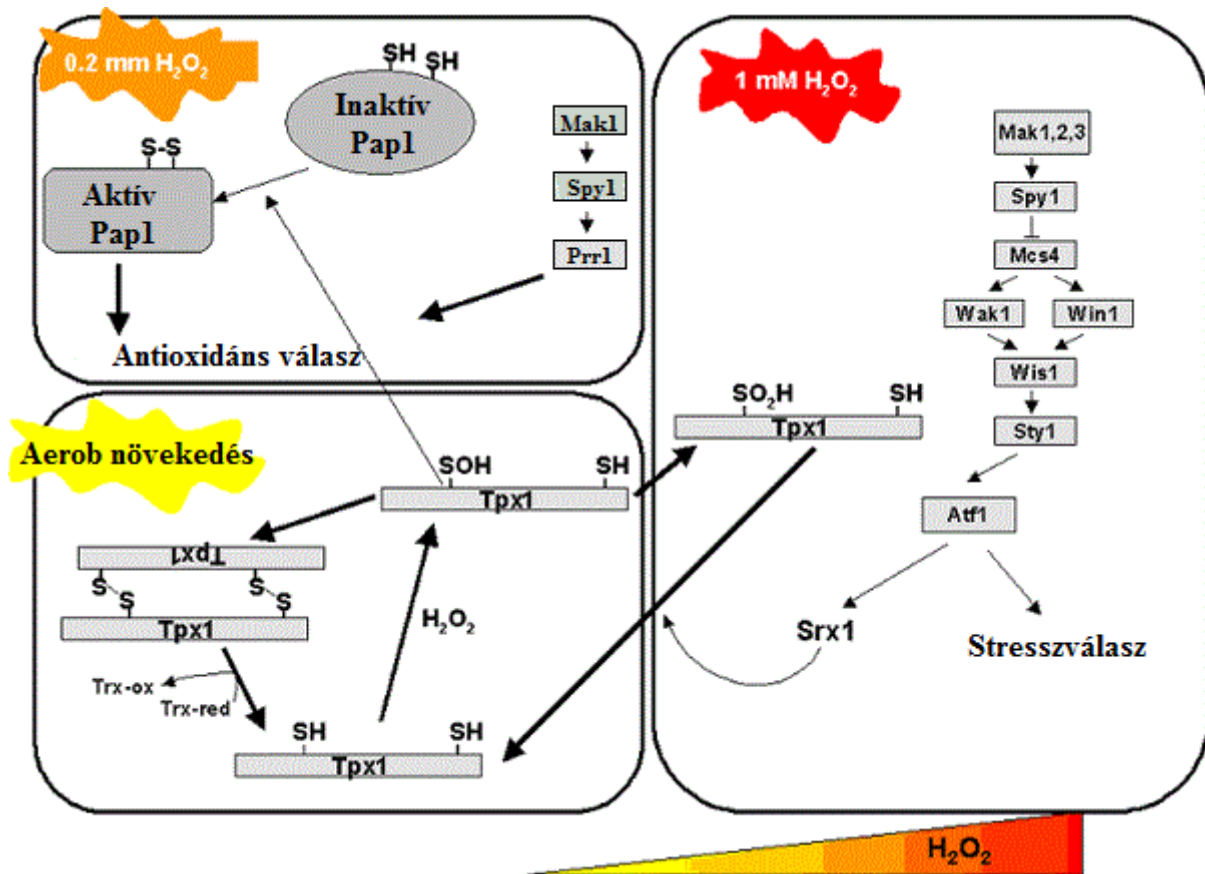
S. pombe-ban az oxidatív stressz érzékelése két fő útvonalon történik. Gyenge oxidatív stressz esetén (kismértékű növekedés a külsőleg adott H_2O_2 szintben) a Pap1 transzkripciós faktor a regulátor, magasabb stressz esetén (magasabb, kb. ötszörös H_2O_2 mennyiségű hatására) pedig a Sty1 útvonal aktiválódik (Quinn és mtsai., 2002; Vivancos és mtsai., 2006).

Stresszmentes körülmények között a Pap1 transzkripciós faktor a citoplazmában lokalizálódik, de a sejtmaggal állandó import és export történik. Két cisztein klasztert tartalmaz, egyet a fehérje központi régiójában, egyet pedig a terminális karboxil régióban. Stressz hatására a két cisztein intramolekuláris diszulfidkötéssel összekapcsolódik, megszűnik a nukleáris export, akumulálódik a sejtmagban és azonnali választ indukál. Ennek az oxidált állapotnak a megszüntetése a tioredoxin-rendszer feladata, amelyet maga az aktivált Pap1 up-regulál. Nagymértékű, tartós stresszhatás esetén a Pap1 útvonal inaktiválódik. Ennek hátterében a Pap1 útvonal upstream komponensének inaktivációja áll. Ez a peroxidredoxin- (Tpx1) rendszer, aminek szabad ciszteinjai magas H_2O_2 behatásra szulfinsavvá oxidálódnak,

ezáltal inaktiválódik és nem kap szignált a Pap1. Ilyenkor egy foszforelé rendszer aktiválódik, aminek első elemei a szenzor hisztidin kináz Mak2,3, amelyek a Spy1 (Mpr1) foszfortranszmitter foszforiláltságát szabályozzák, amely foszfortranszmitter a Mcs4 válaszregulátort irányítja. Az Mcs4 fehérje továbbítja a jelet a MAPK-kináz-kináz (MAPKKK) Wak1-nek (vagy Win1-nek), ami a MAPK-kináz (MAPKK) Wis1-nek, az pedig a MAPK rendszer részét képező Sty1-nek. *S. pombe sty1Δ* mutánsa fokozott érzékenységet mutatott oxidatív stresszre, ozmotikus stresszre, UV fényre, hősokra, nehézfémekre, valamint toxikus kationokra. Hőstressz esetén az upstream útvonal nem megy végbe, a szignál direkt kölcsönhatásba lép a Sty1 foszfatázával, a Pyp1-gyel, ami negatívan szabályozza a Sty1-et, ezáltal megszűnik a Sty1 gátlása. Amikor a Sty1 foszforilálódik valamilyen stresszhatás következtében, akkor a sejtmagban akkumulálódik és vagy köt a promóteréhez és aktiválja a transzkripciót, vagy pedig foszforilálja a saját transzkripciós faktorát. Aktiválja az Atf1 transzkripciós faktort, amely a sejtmagban beindítja az antioxidáns enzimek átírását. Az antioxidáns enzimek átírása mellett az Srx1 szulfiredoxin szintézise is beindul, ami a Tpx1-et reaktiválja.

A szenzor hisztidin-kinázok harmadik tagja a Mak1, amely foszforilálja a Prr1 másodlagos válaszregulátort, ami mind a Sty1-Atf1 útvonaltól, mind pedig a Pap1 rendszertől függetlenül képes antioxidáns válasz kiváltására (Ikner és Shiozaki, 2005; Papadakis és Workman, 2014; Vivancos és mtsai., 2006) (5. ábra).

S. pombe-ban a Sty1-Atf1-en keresztül szabályozódik a GST szintézis ($gst1^+$, $gst3^+$), a CAT ($ctt1^+$), a GPx ($gpx1^+$) és a SOD_{CuZn} ($sod1^+$) (Inoune és mtsai., 1999; Lee és mtsai., 2002; Nakagawa és mtsai., 1999; Veal és mtsai., 2002). A MAPK rendszeren keresztül (Wis1), de függetlenül az ATF1-től szabályozódik a SOD_{Mn} ($sod2^+$) (Jeong és mtsai., 2001). A Pap1-en keresztül szabályozódik a GSH ($gsh2^+$), a CAT ($ctt1^+$), a GR ($pgr1^+$), a GST ($gst2^+$) és a G6PD ($zwf1^+$) (Lee és mtsai., 2002; Nakagawa és mtsai., 1999; Veal és mtsai., 2002).



5. ábra. *S. pombe* oxidatív stresszválasza különböző mértékű oxidatív stressz esetén (Vivancos és mtsai., 2006).

III.4. A *Saccharomyces cerevisiae*

III.4.1. A *S. cerevisiae* általános jellemzése

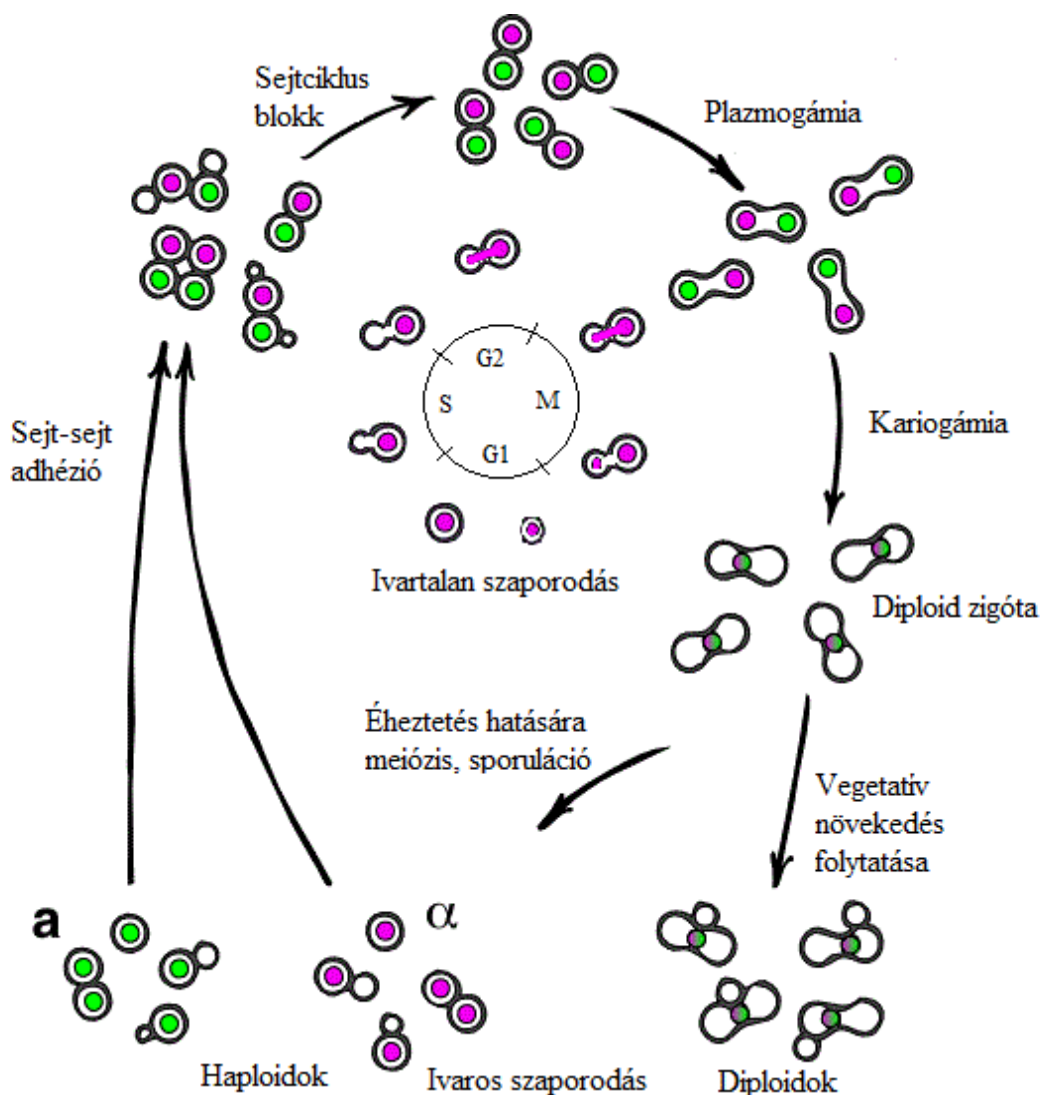
A *S. cerevisiae* sarjadzó élesztő már az ősidők óta meghatározó szerepet tölt be a bor és sör fermentációban, valamint a sütőiparban. Az 1930-as évek óta az egyik legintenzívebben tanulmányozott eukarióta modellszervezet. Ez esetben is kitüntetett figyelmet kapott a sejtciklusnak és a differenciációnak a vizsgálata, továbbá hasznos modellorganizmusnak bizonyult a rekombináció folyamatának megértésében. Az első eukarióta organizmus volt, amelynek a genomját, 1996-ban megszekvenálták (Forsburg, 2005).

A *S. cerevisiae* egy haploid, petite-pozitív eukarióta modellszervezet. Gömb alakú, átlagos keresztmetszete 5-10 μm . Genomja kb. 12,5 megabázis (16 kromoszómán oszlik meg), amely kb 5800 fehérjét kódoló génből (a gének 5%-ka intronokkal megszakított) áll. A genomban magas fokú a redundancia, aminek háttérében egy ősi genom duplikáció áll. Rendszertani besorolását tekintve az *Ascomycota* törzsbe, a *Hemiascomycetes* osztályba, a *Saccharomycetales* (korábban *Endomycetales*) rendbe, és a *Saccharomycetaceae* családba tartozik.

III.4.2. A *S. cerevisiae* sejtciklusa

A *S. cerevisiae* esetében is megkülönböztethetünk ivartalan és ivaros szaporodást. Normál körülmények között az ivartalan szaporodás kerül előtérbe, ekkor a *S. cerevisiae* haploid sejtjei mitózison esnek át. A *S. pombe*-val ellentétben itt normál ütemben zajlik a sejtciklus. A G1-fázisban a sejtek nagyfokú méretbeli növekedésen esnek át, aminek az oka a később ismertetésre kerülő kisebb méretű leánysejt. Az S-fázisban megtörténik a DNS replikációja, illetve a sejten kitüremkedésként megjelenő sarj képzése. A G2-fázisban folytatódik a méretbeli növekedés, valamint megkezdődik a már megkettőződött örökítő anyag transzportja a sarjsejtbe. A lezáró M-fázisban a húzófonalak szétválasztják a kromoszómákat, elkülönül a két sejtmag, majd még az M-fázisban végbemegy a citokinézis. Ennek eredményeként egy nagyobb méretű anyai sejt és egy kisebb méretű leánysejt keletkezik (6. ábra).

Itt is beszélhetünk mind heterotalliáról, mind pedig homotalliáról, továbbá „a” és „ α ” párosodási típusról. Az ivaros szaporodás az eltérő párosodási típusú sejtek konjugációjával történik. Az „a” párosodási típusú sejtek „a” feromont választanak ki, ami kötődik az „ α ” sejtek „a” receptorához. A folyamat a két típus esetén oda-vissza végbemegy. A feromon-receptor interakció jelátviteli utakat aktivál, aminek következtében a konjugáló sejtek sejtciklusa blokkolódik (a G1-fázisban), szinkronba kerül, hogy azonos ütemben folytathassák a reprodukciót. A sejtek citoplazmája összeolvad, amit a kariogámia követ, és létrejön a diploid zigóta. Normál körülmények között a diploid sejtek mitózissal, vegetatív módon szaporodnak tovább. Stressz hatására azonban meiózis történik és a sejtek sporulálnak (Tuite és Oliver, 1991) (6. ábra).



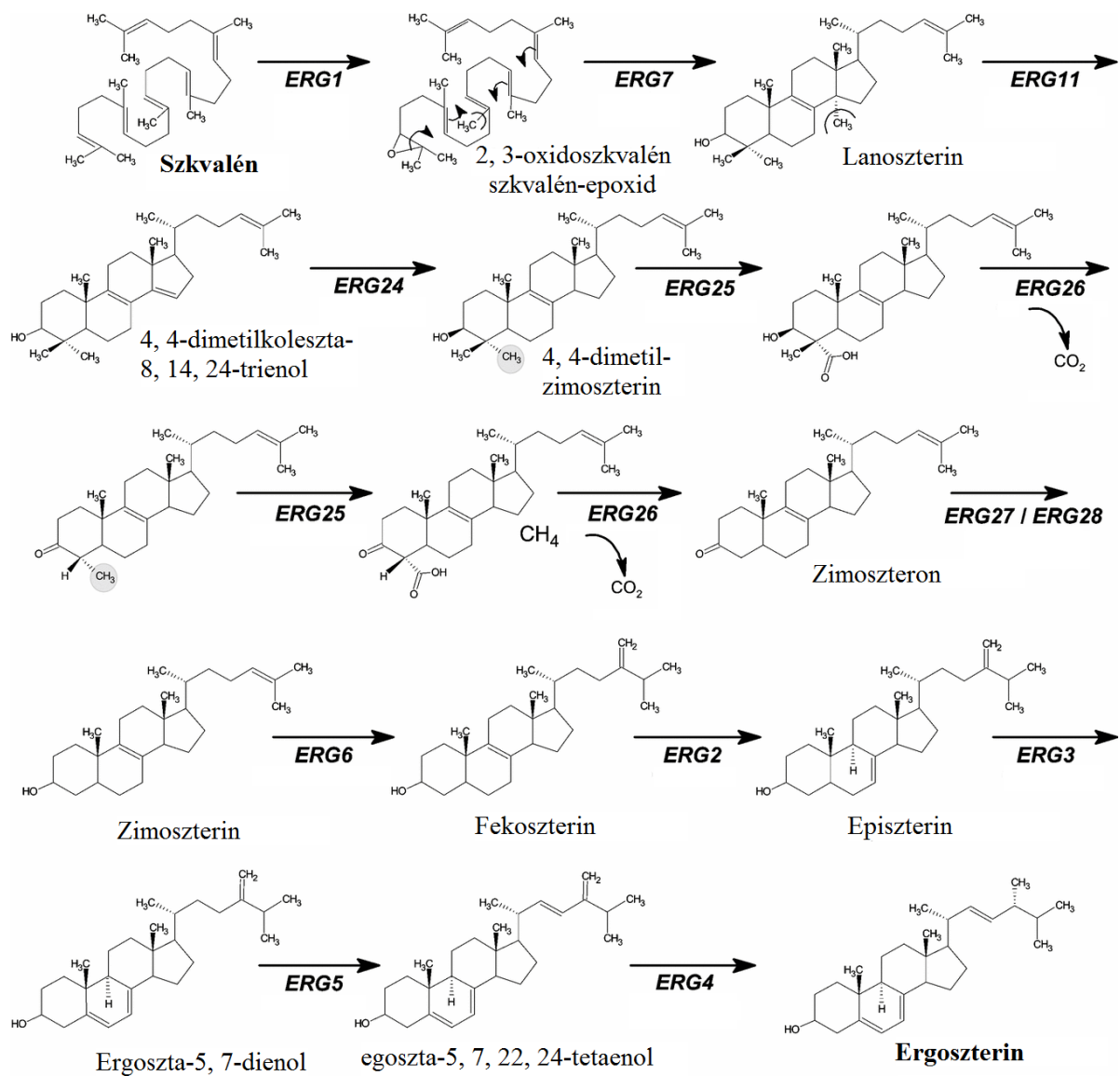
6. ábra. A *S. cerevisiae* sejtciklusa (2. weboldal alapján).

III.4.3. A *S. cerevisiae* szterin-bioszintézise

A szterinek a plazmamembránt alkotó lipidek egyik fontos csoportja, policiklusos szerkezetűek. Fontos strukturális és szabályozó elemeik az eukarióta sejtek membránjainak, ahol a foszfolipidek közé integrálódnak (Eamann és Deleu, 2010). Az emlősök, a növények és a gombák hasonló szterineket állítanak elő, amelyek a kettős kötések számában, illetve elhelyezkedésében, valamint a metil-oldalláncokban különböznek egymástól. Az ergoszterin a szterin bioszintézis végterméke, valamint a fő szterin az élesztősejtekben. Az emlős sejtek koleszterinjéhez hasonlóan, a membrán fluiditásának, permeabilitásának szabályozásában, a membrán-kötött enzimek aktivitásának szabályozásában, az endocitózis folyamatában, valamint a sejtek növekedésében, sejtciklusában tölt be meghatározó szerepet (Iwaki és mtsai., 2008; Lees és mtsai., 1995). A plazmamembrán építőköveként az antifungális szerek egyik fő támadáspontja: a polién antibiotikumok (pl. amfotericin B) szelektíven reagálnak a

membrán ergoszterinjével, és a membránon pórusokat alakítanak ki, amelyen keresztül anyagkiáramlás történik. Az allylaminok gátolják a szkvalén-epoxidáz, a bioszintézis kezdeti lépéséért felelős enzimet (az *ERG1* génterméket). Az azok pedig gátolják a C-14 demetilációját a lanoszterinnek (az *ERG11* génterméket).

Az első prekursor az ergoszterin bioszintézisében a szkvalén, amely két farnesil-difoszfát molekulából jön létre a szkvalén-szintáz segítségével (*ERG9*). Az enzim nagymértékben konzerválódott az élesztőben, illetve az emberben. A szkvalén átalakításáért a szkvalén-epoxidáz felelős (*ERG1*), amely egy oxigén-függő enzim és a lanoszterin prekursorát, a 2,3-oxidoszkvalént állítja elő. Ebből, az *ERG7* gén által kódolt 2,3-oxidoszkvalén-cikláz, vagy lanoszterin-szintáz lanoszterint hoz létre. A bioszintetikus útvonal annyira konzerválódott az eukarióta sejtekben, hogy az *ERG7* géntermékkel azonos enzimet mutattak ki *Arabidopsis thaliana*-ban, a cikloartenol-cikláz, ami a növényi szterinbioszintézisben hasonló szerepet tölt be (Covey és mtsai., 1993). A lanoszterin keletkezése előtti gének esszenciálisak a sejtek életképességéhez, amit az is demonstrál, hogy az *erg9Δ*, az *erg1Δ* és az *erg7Δ* deléciós mutánsok életképtelenek. Azonban ha a zimoszterin és ergoszterin között sérül egy lépés, akkor nem történik esszenciális változás, mert a köztes anyagcseretermékek helyettesíthetők korábban keletkezett szterinmolekulákkal (Iwaki és mtsai., 2008). A lanoszterin C-14-es pozíciójú metil csoportját az *ERG11* gén terméke a citokróm P-450-demetiláz távolítja el. Az így keletkező 4,4-dimetilkoleszta-8,14,24,-trienol tovább redukálódik a C-14-es pozícióban az *ERG24*-es génnek köszönhetően és 4,4-dimetilkoleszta-8,24-dienol keletkezik. A következő lényeges lépés a zimoszterin-fekoszterin átalakítás. Az *ERG6* gén terméke metilálja a C-24-es pozíciót zimoszterinben, hogy létrehozza a 28 szénatomos szterin-struktúrát. A $\Delta 8 \rightarrow 7$ izomeráz a terméke az *ERG2*-es génnek, melynek az episzterin szintézis köszönhető. Ez a lépés az egyik célpontja a morfolin antibiotikumoknak. A bioszintetikus útvonal záró lépéseiben a C-5-deszaturáz (*ERG3*) létrehozza az ergoszta-5,7-dienolt, amiből a C-22-deszaturáz (*ERG5*) az ergoszta-5,7,22,24-tetaenolt, végül pedig a C-24-reduktáz létrehozza az ergoszterint (7. ábra) (Lees és mtsai., 1995). Az ergoszterin bioszintézis tanulmányozásában a *S. cerevisiae* bizonyult a legalkalmasabb modellrendszernek, mivel mutánsai képesek az egyes intermediereket beépíteni az ergoszterin helyére (Lees és mtsai., 1984).



7. ábra. A *S. cerevisiae* ergoszterin bioszintézise

IV. Célkitűzések

A Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Karának Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékén már 1993 óta folynak oxidatív stresszel és membrán-dinamikával kapcsolatos munkák. Ebbe a kutatási projektbe 2007-ben szakdolgozóként kapcsolódtam be, majd később mesterszakos diplomadolgozóként, 2012 óta pedig PhD hallgatóként vettem részt a munkában.

1. Munkám egyik részét a CTN mikotoxin hatásmechanizmusának vizsgálata képezi. Ennek előzményeként, a tanszéken Blaskó és mtsai. (2013) megállapították a toxin plazmamembránra kifejtett fluidizáló hatását az integráns membránfehérjék szabad –SH csoportjaival kialakított kölcsönhatás következményeként, amely a plazmamembrán dezorganizációján keresztül hozzájárul a sejtekből történő esszenciális ionok kiáramlásához. Erre alapozva, terveztük a CTN akut citotoxikus hatásának, oxidatív stresszt generáló hatásának vizsgálatát a haploid, eukarióta, *S. pombe* hasadó élesztőn. Azt várjuk, hogy (i) sikerül megválaszolnunk néhány, a szakirodalomban fellelhető ellentmondásos jelenséget; (ii) bővebb információhoz jutunk az oxidatív stressz CTN hatásmechanizmusban betöltött szerepéről. Ezeknek az ismereteknek a birtokában a jövőben talán lehetőség nyílhat toxinmentesítési, detoxifikációs eljárások kidolgozására, valamint segítséget nyújthat a CTN terményekben és élelmiszerekben megengedett koncentrációjának meghatározásához.

Céljaink voltak:

- 1.1. A még 1987-ben Haraguchi és mtsai. által leírt, pH-függő citotoxicitás ellenőrzése.
- 1.2. A pH-optimum ismeretében a CTN szaporodás-gátlásának vizsgálata, és a kezelésekhez használt szubinhibitorikus koncentráció meghatározása, ahol a sejtek legalább 70%-ka szaporodóképes/életképes.
- 1.3. A CTN sejtbe bejutó, ténylegesen ható koncentrációjának meghatározása, a toxin felvétel-kinetikájának jellemzése.

Akut tesztek alkalmazva

- 1.4. A CTN-indukálta oxidatív stresszfolyamatok vizsgálata a teljes intracelluláris ROS-tartalom, és az egyes ROS-ok kvantitatív meghatározásával. A CTN által előidézett

oxidatív stresszfolyamatok erősségének meghatározásához, a H₂O₂-nak, mint jól jellemzett pozitív kontrollnak a használata.

- 1.5. A *S. pombe* Pap1 és Atf1 transzkripció faktorainak, a CTN-indukálta oxidatív stresszfolyamatok szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata deléciós mutánsok segítségével.
- 1.6. A CTN-indukált oxidatív stresszfolyamatok regulációjának vizsgálata a GSH mennyiségi és az antioxidáns enzimek specifikus aktivitásának meghatározásával.
- 1.7. Az oxidatív károsodások hatására kialakuló sejtmag-fragmentáció vizsgálata és a károsodások javítását célzó sejtciklus-blokk vizsgálata.

2. Munkám másik része az *ERG5* gén mutációja okozta belső stresszhatás következményeinek tanulmányozása, valamint a BY4741 szülői és *erg5Δ* mutáns törzsek *t*-BuOOH-ra, mint külső stresszhatásra adott válaszainak vizsgálata. Számos metabolikus rendellenesség okozhat humán megbetegedéseket, amelyek közül több is kapcsolatba hozható a sejt, a szervezet redox egyensúlyának a megszűnésével. Munkánk második részével választ szeretnénk kapni arra, hogy a fő plazmamembrán rigidizáló ergoszterin bioszintézisét érintő egy génes mutáció hogyan változtatja meg a *S. cerevisiae* sejtek belső oxidoredukciós állapotát, a sejtek hogyan kompenzálják ezt. Az élesztőkön végzett ilyen jellegű kutatások, a mutációk és más okozta megváltozott oxidoredukciós állapotok vizsgálatai során kapott eredmények hozzájárulnak a már említett humán betegségekkel kapcsolatos oxidatív problémák megértéséhez (pl.: Parkinson-kór, Alzheimer-kór kezelése).

Céljaink voltak:

- 2.1. *S. cerevisiae* BY4741 szülői törzsének és ergoszterin-bioszintézisben sérült mutánsparcjának oxidatív stresszorokkal és amfotericin B-vel szembeni érzékenységének vizsgálata. A lipid-peroxidációt indukáló *t*-BuOOH-ra leginkább érzékenynek mutató törzs kiválasztása a további munkához.
- 2.2. A BY4741 szülői törzs és az *erg5Δ* mutáns szterin-összetételének és zsírsav-mintázatának vizsgálata. A plazmamembrán összetételében bekövetkezett változások vizsgálata a plazmamembrán fluiditásának szabályozásában. A plazmamembrán összetételének és biofizikai paramétereinek megváltozása feltételezi a membrán biológiai funkcióinak módosulását. Ennek ellenőrzése a sejtek glicerín-asszimilációján keresztül.

- 2.3. Az *ERG5* gén mutációja által kiváltott megváltozott oxido-redukciós állapot vizsgálata az intracelluláris ROS-ok mennyiségi meghatározásán és az antioxidáns védelmi rendszer aktivitásának vizsgálatán keresztül.
- 2.4. Hosszú távú akut vizsgálatban *t*-BuOOH kezelés okozta plazmamembrán-összetétel és -fluiditás változásának vizsgálata.
- 2.5. A *t*-BuOOH kezelés-indukálta redox folyamatok vizsgálata az intracelluláris ROS-ok mennyiségi meghatározásán és az antioxidáns védelmi rendszer aktivitásának vizsgálatán keresztül.

V. Anyag és módszer

V.1. Mikroorganizmusok és fenntartásuk

Vizsgálatainkhoz a *S. pombe* és a *S. cerevisiae* alábbi törzseit használtuk fel:

Faj	Törzsnév	Genotípus
<i>S. pombe</i>	ura4-D18	ura4-D18, h ⁻
<i>S. pombe</i>	<i>atf1Δ</i> és <i>pap1Δ</i> szülői törzse	leu 1-32 ura4-D18 his7-366 ade6-M210, h ⁺
<i>S. pombe</i>	<i>atf1Δ</i>	<i>atf1::ura4</i> leu 1-32 ura4-D18, h ⁺
<i>S. pombe</i>	<i>pap1Δ</i>	<i>pap1::ura4</i> leu 1-32 ura 4-D18, h ⁺
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741, <i>erg5Δ</i> szülői törzse	MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0
<i>S. cerevisiae</i>	<i>erg5Δ</i>	<i>erg5Δ</i> ; izogenikus a BY4741-gyel, YMR015c::kanMX4

I. táblázat. A vizsgálatok során alkalmazott törzsek

A *S. pombe* jelátviteli mutáns törzseket (*atf1Δ*, *pap1Δ*, valamint a szülői) Dr. J. Millar (Division of Yeast Genetics, National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London) bocsátotta a rendelkezésünkre.

A *S. cerevisiae* szülői és ergoszterin bioszintézis mutáns törzseket Dr. K. Kuchler és Dr. Gy. Sipos (Christian Doppler Laboratory for Infection Biology, Max F. Perutz Laboratories, Medical University of Vienna) bocsátották a rendelkezésünkre.

A törzsek tartós tárolása -80°C-on történt 50% glicerint tartalmazó YEL tápoldatban. Fenntartásuk Petri-csészén, 4°C-on történt, az adott törzs minimál táptalaján. A kísérleteinkhez Petri-csészén, illetve ferdeagaron, az adott törzs minimál táptalaján tenyésztett sejteket használtunk, amelyeket 30°C-on tartottunk maximum egy hétig.

V.2. Táptalajok, tápoldatok, pufferek

SM+uracil tápoldat (*S. pombe* minimál tápoldat): 10 g l⁻¹ glükóz; 5 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 1 g l⁻¹ KH₂PO₄; 0,5 g l⁻¹ MgSO₄; 1 ml l⁻¹ Wickerham-féle vitaminoldat; 100 mg l⁻¹ uracil; szilárd táptalaj esetén 20 g l⁻¹ agarral kiegészítve; pH 4,5 (tápoldat esetén), pH 5,6 (táptalaj esetén).

Wickerham-féle vitaminoldat: 2 mg l⁻¹ folsav, 2 mg l⁻¹ biotin, 400 mg l⁻¹ Ca-pantotenát, 2 g l⁻¹ inozitol, 400 mg l⁻¹ niacin, 200 mg l⁻¹ p-aminobenzoesav, 200 mg l⁻¹ riboflavin, 400 mg l⁻¹ tiamin, 400 mg l⁻¹ pridoxin.HCl.

YEL tápoldat: 5 g l⁻¹ élesztő-kivonat; 30 g l⁻¹ glükóz; kiegészítve az adott kísérletben használt törzs igénye szerint 225 mg l⁻¹ uracillal, leucinnal, adeninnal, lizinnel, metioninnal, argininnal vagy hisztidinnel, amelyek az auxotrófia miatt szükségesek; pH 4,5.

YEA táptalaj: 5 g l⁻¹ élesztő-kivonat; 30 g l⁻¹ glükóz; kiegészítve az adott kísérletben használt törzs igénye szerint 225 mg l⁻¹ uracillal, leucinnal, adeninnal, lizinnel, metioninnal, argininnal vagy hisztidinnel, amelyek az auxotrófia miatt szükségesek; szilárd táptalaj esetén 20 g l⁻¹ agarral kiegészítve; pH 5,6.

YPD (komplett) táptalaj: 10 g l⁻¹ élesztő-kivonat; 20 g l⁻¹ bacto-pepton; 20 g l⁻¹ glükóz, 20 g l⁻¹ agar.

WO tápoldat (*S. cerevisiae* minimál tápoldat): 20 g l⁻¹ glükóz; 6,7 g l⁻¹ élesztő nitrogénforrás; 100 mg l⁻¹ hisztidin, leucin, metionin és uracil; szilárd táptalaj esetén 20 g l⁻¹ agarral kiegészítve; pH 4,5 (tápoldat esetén), pH 5,6 (táptalaj esetén).

V.3. Szaporodás-kinetika mérése

Petri-csészén növesztett sejtekből előkultúrát készítettünk, amit 24 órán keresztül 30 °C-on inkubáltunk. Ezzel beoltottunk 100 ml tápoldatot úgy, hogy az 595 nm hullámhosszon mért optikai denzitása (OD₅₉₅) 0,05 legyen. A kapott tenyészetet 30 °C-on inkubáltuk és 150 fordulat perc⁻¹ fordulatszámra rázattuk. Meghatározott időpontokban a tenyészetből mintát vettünk és mértük az OD₅₉₅-t, illetve Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a sejtszámot. Ezen adatok ismeretében a generációs időt az alábbi összefüggés segítségével határoztuk meg:

$$T = \frac{\lg 2^{t_2 - t_1}}{\lg \frac{y}{x}}$$

ahol T a generációs idő, x a t₁ időpontban mért sejtszám (sejt ml⁻¹), y a t₂ időpontban mért sejtszám. A t₁ és t₂ értékeket a kapott növekedési görbe logaritmikus szakaszából választottuk.

V.4. A CTN citotoxicitás pH-függésének vizsgálata

A CTN pH-függő citotoxikus hatásának vizsgálatához a National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) standard mikrodilúciós módszerét alkalmaztuk (NCCLS, 2002).

48 órás ferdeagaros előkultúráról 5 × 10³ db sejt ml⁻¹ sejtszámú tenyészetet készítettünk minimál tápoldatban. A méréshez steril, egyszer használatos, 96 lyukú mikrotiter lemezt használtunk, a lyukakba 1:1 arányban bemérve a különböző koncentrációjú CTN oldatokat és a sejtszuszpenziót (100–100 μl). A vizsgálandó toxin-koncentrációkat felező

hígítási sor segítségével állítottuk be (1000 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,25 μM), kontrollként 100 μl sejtszuszpenziót használtunk, vakként pedig 200 μl tápoldatot, mely értékkel később korrigáltuk a kapott adatokat. Mind a CTN oldatok, mind pedig a sejtszuszpenziók készítéséhez használt tápoldatok pH-át külön-külön beállítottuk. A pH beállítás 10 M-os NaOH és 10%-os HCl segítségével történt. A vizsgált pH értékek: pH=3,0; pH=4,5; pH=6,0 és pH=8,0 voltak. 30 °C-on 48 óráig inkubáltuk a lemezeket, majd Thermo Scientific Multiskan Ex Primary EIA V. 2.3 készülék segítségével mértük a mikrotiter lemezre felvitt tenyészetek optikai denzitását. A kiértékelés Ascent Software Version 2.6 programmal történt.

V.5. Szaporodásgátlás vizsgálata

A V.3. pontban leírtaknak megfelelően előkultúrát, majd ebből rázatott tenyészeteket készítettünk ($\text{OD}_{595} = 0,05$), amelyeken az alábbi kezeléseket hajtottuk végre:

- (a) a *S. pombe* sejteket 0 μM , 125 μM , 250 μM és 500 μM végkoncentrációban kezeltük CTN-nel,
- (b) a *S. cerevisiae* sejteket 0 mM, 0,4 mM és 0,6 mM végkoncentrációban kezeltük *t*-BuOOH-val.

A vizsgálatokhoz használt CTN-t acetonitrilben oldottuk 250 mM-os törzsoldatot létrehozva, a *t*-BuOOH-t pedig desztillált vízben. A kezelések során a hatóanyag-oldószer térfogatát 0,8%-ban alkalmaztuk.

A tenyészeteket 30 °C-on, 150 fordulat perc^{-1} fordulatszámon rázattuk és meghatározott időközönként mintát vettük és mértük az OD_{595} -t.

V.6. Pusztítási görbe felvétele

Az V.3. pontnak megfelelően rázatott tenyészetet készítettünk, amelyet a közép-logaritmikus fázisba érve 1017 g-n (3000 fordulat perc^{-1}), 5 percig centrifugáltuk, amit egy mosás követett. A kísérletekhez minden esetben közép-logaritmikus fázisú tenyészetet használtunk (Jamieson, 1992, 1998). Visszavettük a sejteket minimál tápoldatba és beállítottuk a sejtszámot 10^7 sejt ml^{-1} -re *S. pombe* esetén, és $2,5 \times 10^7$ sejt ml^{-1} -re *S. cerevisiae* esetén, majd egy órán keresztül kezeltük a sejteket az alábbiak szerint:

- (a) a *S. pombe* sejteket 0 μM , 500 μM , 1000 μM és 2000 μM végkoncentrációban kezeltük CTN-nel,
- (b) a *S. cerevisiae* sejteket 0 mM, 1 mM és 2 mM végkoncentrációban kezeltük *t*-BuOOH-val.

A kezelés során 0, 30 és 60 percnél mintát vettünk (*S. cerevisiae* esetén csak 0 és 60 percnél), amiből ezerszeres hígítást követően 50-50 µl-t három Petri-csészére kiszélesztettünk. 48 órás, 30 °C-os inkubálást követően a telepeket leszámoltuk. A legalább 70-80%-os telepképző számot lehetővé tevő koncentrációt vettük szubinhibitorikus koncentrációnak, amivel a további vizsgálatokat folytattuk.

V.7. Az adaptáció vizsgálata

A pusztítási görbe felvételénél meghatározott szubinhibitorikus koncentrációval egy órán keresztül előkezeltünk 10^7 sejt ml⁻¹ sejtet, amit a kezelés lejártával 3000 fordulat perc⁻¹ fordulatszámra centrifugáltunk 5 percig, egyszer mostuk a sejteket minimál tápoldatban, majd újra beállítottuk a sejtszámot 10^7 sejt ml⁻¹, kiküszöbölve a lehetséges centrifugálási veszteséget. Ezt követően a sejteket a V.6. pontban leírt CTN koncentrációkkal újra kezeltük egy órán keresztül. A kezelés során 0, 30 és 60 percnél mintát vettünk, amiből ezerszeres hígítást követően 50-50 µl-t három petri-csészére kiszélesztettünk. 48 órás, 30 °C-os inkubálást követően a telepeket leszámoltuk (Lee és mtsai., 1995).

V.8. A CTN felvétel-kinetikájának meghatározása

A felvétel-kinetika meghatározásához első lépésként meghatároztuk a CTN fluoreszcens spektrumát Hitachi F-7000 típusú fluoreszcens spektrofotométerrel. A mérést 0,6 M KCl (pH=4,5) oldatban végeztük. A műszer segítségével meghatároztuk a CTN excitációs (340 nm) és emissziós (509 nm) maximumát KCl-ban, illetve külön ellenőriztük, hogy az adott hullámhossz értéken nincsen-e a KCl-nak is elnyelése. A fenti hullámhosszokon lemértük a 1000 µM CTN-ből készített felező hígítási sor minden elemének intenzitását. A kapott értékek alapján kalibrációs görbét készítettünk.

A közép-logaritmikus fázisú sejteket centrifugáltuk, mostuk és felvettük 0,6 M-os pH 7,0-s KCl-ban. A sejtfal-as sejtek esetében a sejtszámot rögtön beállítottuk 10^7 db sejt ml⁻¹-re, továbbá ezeket a sejteket pH 4,5-s KCl-ban vettük fel, figyelembe véve a CTN pH-függő citotoxikus hatását. A protoplasztált mintához 20 ml, 10^8 db sejt ml⁻¹ sejtszámú tenyészetet 2%-os *Trichoderma* enzimmel protoplasztáltunk 30 °C-on, 140 fordulat perc⁻¹-en. 15 perc után, közel 100%-os protoplasztálódottsági állapotnál a sejteket centrifugáltuk, majd kétszer mostuk pH 7,0-s KCl-ban. Ezt követően a sejtszámot újra 10^7 db sejt ml⁻¹ -re állítottuk be immár pH 4,5-s KCl-ban.

A CTN szubinhibitorikus koncentrációjával, 1000 µM CTN-nel kezeltük a sejteket, és különböző időpontokban (0, 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 90 perc) mintát vettünk. A sejteket centrifugáltuk, a felülúszót 340 nm excitációs és 509 nm emissziós hullámhosszak mellett,

húszszorosára hígítva mértük és a kalibrációs görbe alapján meghatároztuk a sejtfalas vegetatív sejtek, illetve a protoplasztok által felvett CTN koncentrációját.

V.9. *S. pombe* jelátviteli mutánsok tesztje

A *S. pombe* jelátviteli deléciós mutánsainak vizsgálatához a V.4. pontban leírt mikrodilúciós módszert alkalmaztuk. Az Atf1 és Pap1 transzkripciós faktorban deletált törzsek érzékenységét vizsgáltuk CTN-nel szemben, a szülői törzshöz viszonyítva.

V.10. Intracelluláris peroxid-koncentráció mérése áramlási citométer segítségével

A közép-log fázisban lévő *S. cerevisiae* sejteket centrifugáltuk, mostuk, és minimál tápoldatban vettük fel. Ezután a sejtszámot beállítottuk $2,5 \times 10^7$ db sejt ml^{-1} -re ($\text{OD}_{595} = 1,0$). A sejtszuszpenziót egy órán keresztül kezeltük 1 mM *t*-BuOOH-val. Ezután a mintákat 10 μM -os végkoncentrációban jelöltük dihidrorodamin 123 (DHR123)-mal

A méréshez BD FACS Calibur típusú áramlási citométert használtunk. 15, 30, 45 és 60 perc elteltével mértük a peroxid koncentráció változását $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm és $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm (FL1 szenzor) mellett. Egy mérés esetében 10 000 sejtet vizsgáltunk. Az eredményeket a Cellquest szoftverrel értékeltük (Carter és mtsai., 1994).

V.11. Intracelluláris szuperoxid-koncentráció mérése áramlási citométer segítségével

S. cerevisiae sejteket az V.5. fejezetben leírtaknak megfelelően készítettük elő és kezeltük *t*-BuOOH-val. A mintákat 10 μM -os végkoncentrációban jelöltük dihidroetidin (DHE)-nel. A méréshez BD FACS Calibur típusú áramlási citométert használtunk. 15, 30, 45 és 60 perc elteltével mértük a peroxid koncentráció változását, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm és $\lambda_{\text{em}} = 585$ nm (FL2 detektor) mellett. A mérések során 10 000 sejtet vizsgáltunk. Az analízis során a mérést követően az FSC és SSC diagramon kapuztunk, csak az élő, egykorú sejteket véve figyelembe. Ezután a sejtek mértani átlagának intenzitását vizsgáltuk (Carter és mtsai., 1994).

V.12. Intracelluláris peroxid- és szuperoxid-koncentráció mérése fluoriméterrel

A közép-log fázisban lévő *S. pombe* sejteket centrifugáltuk, mostuk, és minimál tápoldatban vettük fel. Ezután a sejtszámot beállítottuk 10^7 db sejt ml^{-1} -re ($\text{OD}_{595} = 0,7$). A sejtszuszpenziót egy órán keresztül kezeltük 1000 μM CTN-nel vagy 200 μM H_2O_2 -val, majd egyszeri mosást követően a mintákat 10 μM -os végkoncentrációban jelöltük DHR123-mal, vagy DHE-vel. 15 perces kinetikai mérést hajtottunk végre. Ezt követően kalibrációs egyenest vettünk fel rodaminra a peroxidok mérése esetén, illetve etídium-bromidra a szuperoxid gyök

koncentrációjának mérésénél. Az alkalmazott hullámhosszak megegyeznek a V.10 és V.11. pontban leírtakkal.

V.13. Intracelluláris összes ROS-koncentráció mérése fluoriméterrel

A közép-log fázisban lévő *S. pombe* sejteket centrifugáltuk, mostuk, és minimál tápoldatban vettük fel. Ezután a sejtszámot beállítottuk 10^7 db sejt ml^{-1} -re ($\text{OD}_{595} = 0,7$). A sejtszuszpenziót egy órán keresztül kezeltük $1000 \mu\text{M}$ CTN-nel vagy $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 -val. Egyszeri mosását követően, 6 ml tenyészetet jelöltünk egy órán keresztül $24 \mu\text{l}$ (3 mg ml^{-1} törzsoldatból) 2',7'-diklorofluorescein diacetáttal (DCFDA), majd $3000 \text{ fordulat perc}^{-1}$ fordulatszámra 5 percig centrifugáltuk, egyszer mostuk és $1 \text{ ml } 4 \text{ }^\circ\text{C}$ -os, 5%-os szulfoszalicilsav (SSA) oldatban vettük fel a sejteket. 20 percet jégen inkubáltuk, 5 percenként felkevertük a sejteket, majd 10 percig $10000 \text{ fordulat perc}^{-1}$ fordulatszámra, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on centrifugáltunk. Ezt követően $0,5 \text{ ml}$ felülúszóhoz $0,5 \text{ ml } 2 \text{ M}$ -os NaOH-t adtunk. A mérés fluoriméterrel 502 nm excitációs és 525 nm emissziós hullámhossz mellett történt $2,5 \text{ nm}$ rés és 700 V erősítés mellett. Kalibrációs görbét készítettünk, melyhez a festék oxidált formáját 2',7'-diklorofluoresceint (DCF) használtuk SSA és NaOH 1:1 arányú keverékében oldva. Vakként nem festett tenyészetet is mértünk, mivel a sejteknek is lehet fluoreszcenciája (Royall és Ischiropoulos, 1993).

V.14. Minták előkészítése hidroxilgyök- és enzimaktivitás-mérésekhez

100 ml közép-log fázisú tenyészetet egy órán keresztül kezeltünk a szubinhibitorikus koncentrációjával a megfelelő vegyületnek, majd kétszer 5 percig, $3000 \text{ fordulat perc}^{-1}$ fordulatszámra hűtve centrifugáltuk, kétszer foszfát pufferban mostuk, végül felvettük 8 ml foszfát pufferban ($\text{pH } 7,0$). A centrifugált mintát 25 ml -es főzőpoharakban $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra raktuk. Több napi fagyást követően feltártuk a sejteket X-press sejtfeltárával (X-PRESS 25 ml , AB BIOX, Sweden). A gépet használat előtt legalább 24 órával behűtöttük. Két feltárás között legalább két órát hűtöttük a készüléket. Az X-press-be helyezett mintát további 20 percig együtt fagyasztottuk. A feltárt mintákat a továbbiakban $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk (Emri és mtsai., 1994).

V.15. Intracelluláris hidroxilgyök koncentrációjának mérése

A mérés napján gyakori keverés mellett szobahőmérsékleten engedték fel a mintákat. $50 \mu\text{l}$ fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF, 10 g l^{-1}) oldatot közvetlenül az eppendorf csövekbe mértünk, majd a mintából felolvadás után azonnal $1450 \mu\text{l}$ -t adtunk a már eppendorf csőben lévő PMFS oldathoz. $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -os, hűtött centrifugában $10\,000 \text{ fordulat perc}^{-1}$ sebességgel 10

percig centrifugáltunk, majd a felülúszót leöntöttük és a továbbiakban ezt használtuk az enzimaktivitások mérésére. A kísérlet további részében a mintákat jégen tároltuk.

A mérés során 10 mM-os Hepes puffert használtunk (pH 7,6). A további oldatokat frissen készítettük:

1. Gyökfogónak N-tert-butil- α -fenil-nitront (PBN) használtunk, amelyből egy 1 M-os törzsoldatot készítettünk etanol és víz 1:1 arányú keverékében oldva. Ezt 10-szeresére hígítva használtuk a mérés során.
2. 20 mM-os Cr(VI) törzsoldat desztillált vízben oldva.

A méréshez ESP 300E típusú spektrométert használtunk. A Cr(VI) oldatot tízszeresre hígítva használtuk. Mérés során a reakció végtérfogata 150 μ l volt, a méréshez 120 μ l-es kapillárist használtunk. A méréshez a következő összetevőket mértük össze a következő sorrendben:

PBN + Cr(VI): 90 μ l puffer, 30 μ l minta, 15 μ l PBN, 15 μ l Cr(VI) törzsoldat.

Az elegyeket összeráztuk, és öt perc múlva tizenöt percen keresztül mértük. A Cr(V) koncentrációját a Cr(V) jel kettős integráljának értéke adta meg. Kalibrációnak stabil nitroxid gyök oldatot (4-maleimide-TEMPO, 10 μ M) használtunk. (10 μ M koncentrációjú spinjelölő spektrumának kettős integrálját hasonlítottuk össze a kérdéses minta kettős integráljával azonos spektrumparaméterek mellett történő mérés után).

A mérés során alkalmazott EPR-beállítások: mikrohullámú teljesítmény-erősítés 5 vagy 10 mW; tér moduláció 100 kHz; amplitúdó 0,1-0,2 mT; a vizsgált mágneses tartomány 10 mT (100 G). A spinkoncentráció meghatározása relatív mérés segítségével készült (Shi és Dalal, 1990).

V.16. Glutation-koncentráció és -enzimaktivitás mérések

Az enzimaktivitás mérésekhez fagyasztott mintákat a mérés napján a hidroxilgyök mérésénél leírtakhoz hasonlóan (V.14.) készítettük elő a méréshez. Az előkészítés után a mintákat jégen tároltuk. A felülúszó leöntése után maximum két órán keresztül használtuk a mintákat az enzimaktivitás mérésekhez.

V.16.1. GSH- és GSSG-koncentráció mérése

15 ml, egy órán keresztül a szubinhibitorikus koncentrációval kezelt mintát centrifugáltunk 3000 fordulat perc^{-1} fordulatszámom 5 percig, kétszer mostuk fiziológias sóoldattal és 1 ml 4 °C-os, 50 g l^{-1} koncentrációjú szulfoszalicilsav oldatban vettük fel. Inkubáltuk 20 percig 4 °C-on, majd 10 percig centrifugáltuk 10000 fordulat perc^{-1} fordulatszámom 4 °C-on, és a felülúszóval dolgoztunk tovább. A méréshez a következő puffert

készítettük:

19,73 g l⁻¹ NaH₂PO₄ és 22,32 g l⁻¹ Na₂EDTA (pH 7,5).

Frissen készítettük a következő oldatokat, jeges vízben tároltuk őket:

A oldat: 0,3 mM NADPH .

B oldat: 5 mM 5,5-ditio-bisz(2-nitrobenzoik sav) (DTNB)

C oldat: 60 µl glutation-reduktázt 540 µl desztillált vízben oldottunk fel.

A minta előkészítése:

GSSG méréshez 600 µl mintát eppendorfba raktunk, majd hozzáadtunk 12 µl 4-vinilpiridint és 25 µl trietanolamint. GSH méréséhez az előbb leírtak szerint készítettük elő a mintát, de nem adtunk hozzá 4-vinilpiridint és nem inkubáltuk.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze kvarc küvettába, a következő sorrendben:

GSH mérésnél: 10 µl minta, 90 µl puffer, 800 µl A oldat, 100 µl B oldat, 20 µl C oldat.

GSSG mérésnél: 100 µl minta, 800 µl A oldat, 100 µl B oldat, 20 µl C oldat.

A méréseket 412 nm-en végeztük, és egyszerre 3 párhuzamos mérést végeztünk (Anderson, 1995).

A mintánk GSH- és GSSG-tartalmát kalibráló sor segítségével határoztuk meg, majd a kapott értékeket fehérjetartalomra vonatkoztattunk (Anderson, 1995).

V.16.2. Tiol-tartalom meghatározása

A mérés előtt a következő oldatokat készítettük el:

0,1 M nátrium-foszfát puffert készítettünk Na₂HPO₄ x 7H₂O és NaH₂PO₄ x H₂O felhasználásával, pH 7,0.

0,3 M TRIS-hez adtunk 1 mM EDTA-t, majd a pH-t beállítottuk 8,4-re,

50 g l⁻¹-es triklórecetsav (TCA) oldat 1 mM EDTA-val kiegészítve,

20 g l⁻¹-es NaHCO₃-hoz adtunk 10 g l⁻¹ végkoncentrációban DTNB-t.

Az egy órán keresztül kezelt sejteket 3000 fordulat perc⁻¹ fordulatszámon centrifugáltuk, mostuk foszfát pufferben, majd úgy vettük vissza a foszfát pufferbe, hogy a sejtsűrűség 10⁸ db sejt ml⁻¹ legyen. Megegyező térfogatú TCA oldatot adtunk a szuszpenzióhoz, amivel 20 percen keresztül inkubáltuk a mintákat úgy, hogy 1 percet kevertettük, 1 percet pedig jégen hűtöttük őket. Ezt követően 10 percig, 10000 fordulat perc⁻¹ fordulatszámon centrifugáltunk és a felülúszóval dolgoztunk tovább.

Kvarc küvettába a következőket mértük össze sorrendben:

1800 µl TRIS, 200 µl minta, 20 µl DTNB, majd 412 nm-en mértük az abszorbancia változást kb. 10-15 másodpercig, míg stabilan nem kaptunk egy értéket. Vakként a mintanélküli oldatot mértük le, amit levonva a kapott értékekből kaptuk a ΔA értékét, amit a további számoláshoz használtunk fel (Lewinska és Bartosz, 2008):

$$\text{Tiol csoportok (mM l}^{-1}\text{)} = (\Delta A \times \text{hígítás mértéke}) \varepsilon_{412}^{-1}$$

$$\varepsilon_{412} = 13,6 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$$

V.16.3. Glutation-reduktáz specifikus enzimaktivitásának mérése

Pufferként GR puffert használtunk (0,1 M-os foszfát puffer, pH 7,6), illetve frissen készítettük az 1 mM-os NADPH és a 10 mM-os GSSG oldatokat.

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

100 µl NADPH, 700 µl GR puffer, 150 µl GSSG, 50 µl minta.

1 percen keresztül 340 nm-en fotometráltunk, 3 párhuzamos mintát mértünk és az ezekre kapott eredményt átlagoltuk, az enzimaktivitást pedig ebből számoltuk.

Az enzimaktivitás értékeket ($\text{nmol} \cdot \text{perc}^{-1}$) az extinkciós koefficiens ismeretében ($\varepsilon_{\text{NADPH}, 340 \text{ nm}}: 6,3 \times 10^6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a Lambert-Beer törvény alapján számoltuk ki és a minták fehérje tartalmára vonatkoztatva (specifikus enzimaktivitás) adtuk meg [$\text{nmol} (\text{perc mg fehérje})^{-1}$] (Pinto és mtsai., 1984).

V.16.4. Glutation-peroxidáz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez készítettünk 50 mM-os Tris/HCL-t és 0,091 mM EDTA-át tartalmazó puffert. Továbbá frissen készítettük az alábbi oldatokat:

1 mM NADPH-t; 19,5 mM GSH-t, valamint 180 µl desztillált vízben 20 µl GR enzim szuszpenziót oldottunk fel,

Kumén-hidroperoxid oldat (CHP) oldat: 3,3 ml pufferbe 6 µl CHP oldatot mértünk.

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

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

340 nm-en fotometráltunk 1 percen keresztül, egyszerre 3 párhuzamos mintát mértünk Ezek átlagából számítottuk az enzimaktivitást. Az enzimaktivitás értékeket a GR mérésnél megadottakkal megegyező módon adtuk meg (Chiu és mtsai., 1976).

V.16.5. Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez 20 mM-os Hepes puffert, valamint 200 mM MgCl_2 oldatot használtunk. A mérés napján frissen készítettük az alábbi oldatot:

A oldat: 0,75 mM G6P, 0,65 mM NADP, hozzáadtunk 2,25 ml $MgCl_2$ oldatot és feltöltöttük 15 ml-re Hepes pufferral.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze kvarc küvettában az alábbi sorrendben: 900 μ l A oldat, 75 μ l puffer, 25 μ l minta.

340 nm-en fotometráltunk 1 percen keresztül, egyszerre 3 párhuzamos mintát mértünk Ezek átlagából számítottuk az enzimaktivitást. Az enzimaktivitás értékeket a GR mérésnél megadottakkal megegyező módon adtuk meg (Emri és mtsai., 1994).

V.16.6. Glutation-S-transzferáz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez 0,1 M-os foszfát puffert használtunk, illetve frissen készítettük a következő oldatokat:

20 mM GSH, 33 mM CDNB.

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

50 μ l CDNB, 800 μ l puffer, 100 μ l minta, 50 μ l GSH.

340 nm-en fotometráltunk 1 percen keresztül, egyszerre 3 párhuzamos mintát mértünk Ezek átlagából számítottuk az enzimaktivitást. Az enzimaktivitás értékeket ($nmol\ perc^{-1}$) az extinkciós koefficiens ismeretében ($\epsilon_{GS-DNB, 340\ nm}: 9,6 \times 10^6\ cm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$) a Lambert-Beer törvény alapján számoltuk ki és a minták fehérje tartalmára vonatkoztatva (specifikus enzimaktivitás) adtuk meg [$nmol\ (perc\ mg\ fehérje)^{-1}$] (Warholm és mtsai., 1985).

V.16.7. Kataláz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez 20 mM-os Hepes puffert használtunk, illetve frissen készítettük egy 0,1 mM-os H_2O_2 oldatot

A mérés során a következő összetevőket mértük össze kvarc küvettában az alábbi sorrendben: 100 μ l H_2O_2 , 880 μ l puffer, 20 μ l enzimkivonat.

240 nm-en fotometráltunk 1 percen keresztül, egyszerre 3 párhuzamos mintát mértünk Ezek átlagából számítottuk az enzimaktivitást. Az enzimaktivitás értékeket ($\mu mol\ perc^{-1}$) az extinkciós koefficiens ismeretében ($\epsilon_{H_2O_2, 240\ nm}: 4,36 \times 10^4\ cm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$) a Lambert-Beer törvény alapján számoltuk ki és a minták fehérje tartalmára vonatkoztatva (specifikus enzimaktivitás) adtuk meg [$\mu mol\ (perc\ mg\ fehérje)^{-1}$] (Roggenkamp és mtsai., 1974).

V.16.8. Szuperoxid-dizmutázok specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez az alábbi puffert készítettük: 0,533 g l^{-1} dietiléntriaminpenta-acetiksav (DETAPAC), 8,2 g l^{-1} K_2HPO_4 és 0,44 g l^{-1} KH_2PO_4 (pH 7,8). A puffert 4 °C-on tároltuk. Frissen készítettük az alábbi oldatokat:

a-oldat: $1,84 \text{ g l}^{-1}$ nitro-kék-tetrazólium (NBT) (jégen, alufóliába burkolva tároltuk).

b-oldat: $0,33 \text{ g l}^{-1}$ xantin (szobahőmérsékleten történő beoldás után jégen tároltuk).

Ezután összeállítottuk a következő oldatokat:

A-oldat: 18,9 ml pufferhez 0,8 ml a-oldatot (NBT) és 5,4 ml b-oldatot (xantin) adtunk (jégen, alufóliába burkolva tároltuk).

B-oldat: 2,5 ml pufferhez 250 μl xantin-oxidázt oldottunk fel (jégen tároltuk).

A méréshez a következő összetevőket mértük össze az alábbi sorrendben:

800 μl A-oldat, 100 μl minta, 50 μl B-oldat, 50 μl puffer.

A mérést 560 nm-es hullámhosszon végeztük 1 percig, 30 másodperces késleltetéssel indítva. Először lemértük a referencia-oldatokat (puffer és minta), majd minden minta előtt mértünk egy minta nélküli enzim vakot, aminek az abszorbancia értékét kivontunk a mérés eredményéből a referencia-oldat abszorbancia-értékével együtt.

A számolást a következő módon végeztük:

1 egység = (vak átlaga/minták átlaga)-1

Mn(III)SOD mérésnél az A-oldathoz 5 mg NaCN-ot adtunk, és a minta hozzáadása után 30 percet inkubáltuk az elegyet. Ezután adtuk hozzá a B-oldatot (Oberley és Spitz, 1984).

V.17. Fehérje-tartalom mérése

A kísérlet végrehajtása során a következő törzsoldatokat használtuk fel: CTC ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 g l^{-1} , Na/K-tartarát 2 g l^{-1} , Na_2CO_3 100 g l^{-1}), SDS (50 g l^{-1}), NaOH (32 g l^{-1}) oldatok illetve a Folin-Ciocalteu's reagens, valamint A és B reagensok.

A reagens: CTC, SDS és NaOH 1:2:1 arányban;

B reagens: Folin reagens és desztillált víz 1:5 arányban.

A feltárt és kiolvasztott mintákat az előkészítést követően százszorosára hígítottuk. Ezekből pedig minden esetben három párhuzamos mintát készítettünk. Ehhez az oldathoz 1 ml A reagenst adtunk, vortexeltük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A tíz perc leteltével 0,5 ml B reagenst adtunk az elegyhez és újabb 20 percig inkubáltuk, majd 750 nm-en fotometráltuk a mintákat. Vakként desztillált vizet, illetve az A és B reagenst tartalmazó oldatot használtunk. A kalibrációhoz BSA oldatot használtunk ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ koncentrációban) (Peterson, 1983).

V.18. A CTN sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata

Közép-logaritmikus fázisú tenyészetet centrifugáltunk, mostunk és a sejteket SM+ura tápoldatban vettük fel. A sejt számot 10^7 db sejt ml^{-1} -re állítottuk be. 1 ml tenyészeteket kezeltünk $1000 \mu\text{M}$ CTN-nel 1 órán át, illetve a kontrollhoz megegyező térfogatban az

oldószerként használt acetonitrilt adtuk hozzá. A kezelés után a sejteket 2000 fordulat perc^{-1} - en lecentrifugáltuk, majd a pelletet 1 ml desztillált vízben felszuszpendáltuk, 35 másodpercig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, majd a sejteket 1 ml 70%-os etanolban vettük fel. 300 μl -t átpipettáztunk eppendorf-csőbe (három párhuzamos mintát készítve), majd a sejteket ismét 35 másodpercig centrifugáltuk, és utána a felülúszót ismét leöntöttük. A sejteket felvettük 1 ml 50 mM-os nátrium-citrátban, majd ismét 35 másodpercig centrifugáltunk. Ezután a sejteket 500 μl nátrium-citrátban vettük fel, és hozzáadtunk 0,1 mg ml^{-1} koncentrációjú RNáz-A-t. 37 °C-on 2 órán keresztül inkubáltunk. Ezután 500 μl , 50 mM-os nátrium-citrátban oldott, 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -es koncentrációjú propidium-jodid (PI) festékkel a sejteket megjelöltük. 4 °C-on egy éjszakán át tároltuk a mintákat. A méréshez BD FACS Calibur típusú áramlási citométert használtunk, FL1 csatornán keresztül detektálva a PI jelét ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$) (Sabatinos és Forsburg, 2009).

V.19. *S. pombe* sejtmag morfológiájának vizsgálata

Közép-log tenyészetből származó sejteket centrifugáltunk, mostunk és vettünk fel SM+ura tápoldatban. A sejtszámot 10^7 db sejt ml^{-1} -re állítottuk be. A sejteket 60 percig kezeltük 1000 μM CTN-nel. 4-5 μl sejtsuszpenziót szétoszlattunk tárgylemezen, majd beszáradás után 3 μl 4',6-diamidino-2-fenilindol festékkel (DAPI, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) festettük, és fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse 80i, UV szűrővel) vizsgáltuk a sejteket, majd fotókat készítettünk. Kezelésenként legalább 300 sejtet vizsgáltunk.

A DAPI fluoreszcens jelölő, amely a duplaszálú DNS-hez kötődik. Gerjesztési maximuma 358 nm, emissziós maximuma 461 nm, kék fluoreszcenciát mutat.

V.20. Az *erg5Δ* mutáns antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata

S. cerevisiae háromnapos tenyészetéről 1-1 kacsnyit felszuszpendáltunk 4 ml fiziológiás sóoldatban, amiből létrehoztunk egy 4×10^6 db sejt ml^{-1} szuszpenziót. WO táptalajt, illetve a vizsgált xenobiotikumok [amfotericin B, *t*-BuOOH, H_2O_2 , menadion, CdCl_2 , Cr(VI)] megfelelő koncentrációját tartalmazó Petri-csészékre 10^5 db sejtet (25 μl) vittünk fel foltoltással. A Petri-csészéket 30 °C-on inkubáltuk, majd 5 és 10 nap elteltével értékeltük a telepképzést egy 0-5-ig terjedő skálán (Czakó-Vér és mtsai., 1999).

V.21. Minták előkészítése lipid- és szterin-analízishez

Törzsenként, hatszor 250 ml *S. cerevisiae* tenyészetet öt órán keresztül kezeltünk 1 mM *t*-BuOOH-val, majd a kezelését követően a hat tenyészetet egybefugáltuk és felvettük a sejteket nedves tömeg grammonként 20 ml metanol:kloroform 2:1 arányú keverékében,

vortexszel erősen kevertettük, majd egy órában keresztül szobahőmérsékleten állni hagyjuk, közben kb. 10 percenként alaposan megkevertük. Ezt követően a szuszpenziót 4600 fordulat perc^{-1} fordulatszámra 10 percig centrifugáltuk, leöntöttük a felülúszót, ezt használtuk tovább, amit 2-3 rétegű szűrőpapíron keresztül átszűrünk, ezáltal víztiszta folyadékot kaptunk.

Ezután megmértük az oldatunk térfogatát és 1,2-szer nagyobb mennyiségű 0,9%-os KCl oldatot adtunk hozzá. Kémiai rázólabákban egy percen keresztül erősen ráztuk. 10 perc állást követően, a kloroform frakció lesüllyedt a labák aljára és egy centrifugacsőbe engedték a kloroform 99%-át. A mintákat 4600 fordulat perc^{-1} fordulatszámra 10 percen keresztül centrifugáltuk és az alulúszóval dolgoztunk tovább. Vízszivattyúval leszívuk a felülúszó nagy részét, pipettával átpipettáztuk az alsó oldatunkat egy 100 ml-es labákba. Üvegtölcsérbe tettünk kétrétegű szűrőpapírt, majd ebbe tettünk kb. 2-3 gramm vízmentes Na_2SO_4 . Ezen átszűrük az oldatunkat, vízmentessé téve azt. Az oldatot egy 100 ml-es labákba szűrjük rögtön. Ezt követően a kloroformot elpárologtattuk nitrogéngáz alatt. Amikor az összes kloroform elpárologott, akkor tettünk a labákba 2 ml kloroformot, jól megkevertük, hogy a labák faláról lehetőleg az összes lipid beoldódjon. Ezután áttettük kis viálcsőbe (a cső súlyát üresen is megmértük) kb. 0,8 ml-t és elpárologtattuk a kloroformot. Beletettük a maradék kloroformot is, elpárologtattuk, majd az egészet megismételtük még egyszer. Így a végén egy kis viálcsőben volt bepárolva az összes lipidünk. Ezután megmértük a cső súlyát és kiszámítottuk az összegyűlt lipid mennyiségét. A mintákat $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A további mérések előtt felvettük a mintákat 500-1000 μl kloroform: metanol 1:1 arányú keverékében (Kálmán és mtsai., 2013).

V.22. BY4741 és *erg5Δ* törzsek szterin-analízise

Mintáink szterin tartalmának meghatározásához kb. 20 mg lipidre van szükség, tehát ha 80 mg lipidet vettünk fel 1 ml kloroform-metanol keverékben, akkor ebből 250 μl -t használtunk fel a méréshez.

A lipidoldatunkat áttettük egy csavaros kupakos kb. 10 ml-es üvegcsőbe. Nitrogéngáz alatt elpárologtattuk az oldószert, majd felvettük a mintát 1 ml 25%-os KOH-ot tartalmazó etanol oldatban. Vortex segítségével homogenizáltuk a mintát, majd $90\text{ }^\circ\text{C}$ -os vízfürdőbe helyeztük egy órára. Negyedóránként felkevertük a mintát. Az egy óra leteltével kivettük a vízfürdőből a mintát és adtunk hozzá 1 ml desztillált vizet. A mintákat szobahőmérsékletre hűtöttük és hozzáadtunk 2 ml hexánt, egy percig vortexeltük, majd hagyjuk állni 5 percig. A hexános felülúszóban lévő mintát, áttettük egy olyan üvegbe (lemértük a súlyát üresen), amiből vagy nitrogénnel el tudjuk párologtatni a hexánt, vagy olyan üvegcsőbe, amelyet egy

vízvákuumszivattyúhoz tudunk csatlakoztatni. Ezután még egyszer megismételtük a 2 ml hexán adásától a folyamatot. A hexánt elpárologtattuk, majd megmértük az üvegünk súlyát, így tudtuk, hány mg szterolunk van. Ezután az üvegcsébe tettünk 200 µl hexán:etil-acetát 1:1 arányú keverékét. Jól átkevertük az üvegcsét a szuszpenzióval és áttettük egy viálcsőbe. Ezt megismételtük még egyszer 200 µl, majd 100 µl hexán:etil-acetát szuszpenzióval. Így a szterolunk 500 µl szuszpenzióban lesz feloldódva. A minta további bekonzentrálása végett az 500 µl szuszpenziót újból elpárologtattuk nitrogénnel, majd felvettük a szterinünket 25 µl kloroformban. Mérésenként 1 µl mintát használtunk fel, a mérés Agilent Technologies, 6890N, Network GC system, 7683 series Injector, 5975c NL MSD típusú készülékkel történt (Arthington-Skaggs és mtsai., 1999).

V.23. BY4741 és *erg5Δ* törzsek zsírsav-analízise

Totál zsírsav mennyiségének meghatározása

A V.21. pontban készített mintánkból 50 µl-t mértünk eppendorf csőbe, amihez adtunk 700 µl hexán-kloroform oldatot (9:1) és 100 µl transzészterifikációs reagenst (30 ml etanol + 20 ml benzén + 1,15 mg fém nátrium + 7,5 mg fenolftalein). Vortex segítségével homogenizáltuk az oldatot, majd állni hagytuk 20 percig. Ez után 200 µl met-HCl-t adtunk az oldatunkhoz. Egy rövid vortexes kevertetést követően 5000 fordulat perc⁻¹ fordulatszám 4 percig centrifugáltunk. A felülúszónak kb. kétharmadát átmértük egy üvegcsőbe és ezt használtuk fel a gázkromatográfiás mérésekhez.

Poláris zsírsav, triacil-glicerol zsírsav és szabad zsírsav mennyiségi meghatározás

A mintákat megfuttattuk TLC lapokon (MERCK 1.05553.0001, 25 TLC alumínium sheets, 20 × 20, Silicagel 60), hogy jó-e a lipid mintánk. Két lapot készítünk, egyet a poláros lipideknek, egyet pedig a neutrálisoknak. Ezután elkészítettünk két futtató oldatot.

- Poláris lipideknek: kloroform:aceton:metanol:ecetsav:deszt víz = 50:20:10:10:5
- Neutrális lipideknek: dietil éter:hexán:ecetsav = 20:80:1

Az összemérést követően mindkét oldatot alaposan összeráztuk.

Ezután kádba tettük a lemezeket és hagytuk addig futni őket, amíg már csak kb. másfél cm volt vissza a futtatásból. Ezután kivettük a lemezeket a kádból és hagytuk őket szobahőmérsékleten megszáradni. Ezt követően leöntöttük a lemezeket felülről lefele csorgatva 5%-os H₂SO₄-et tartalmazó metanol oldattal, hogy az egész lemezt érje. Ezt is hagytuk megszáradni és ezután hőlégfúvóval (Extol, 1-es fokozat 350 °C, 2-es fokozat 550 °C) melegítjük egyes fokozaton kb. 50 cm-ről, amíg a csíkok meg nem jelentek. Ha a csíkok

nem jelentek meg, akkor melegítés helyett jód gőzös kezelést használtuk (aktív jódot tartalmazó kádba tettük a lemezt, kb. 5 percig benne hagytuk), a lipidek sárga foltokban megjelentek, amiket ceruzával bejelöltünk a lemezen. Az előhívott TLC lapot beszkeneltük és Adobe Photoshop 9.0 programmal a standardokhoz viszonyítva meghatároztuk a foltok erősségét. A neutrális TLC lapon a következő sorrendben váltak szét a lipidek: a poláros lipidek helyben maradtak, ezt követik a monoacil-glicerolok, az ergoszterin, a diacil-glicerolok, a lanoszterin, a szabad zsírsavak, a triacil-glicerolok, végül a szkvalén válik el.

A lemezekről lekapartuk a vizsgálni kívánt csíkokat és végrehajtottuk rajtuk a fent leírt észterifikációs eljárást, majd mértük a zsírsavak mennyiségét (Christoperson és Glass, 1969).

V.24. Fluoreszcens anizotrópia meghatározása

10^7 sejt ml^{-1} sejtkoncentrációjú *S. cerevisiae* tenyészeteket 1 órán keresztül 1 mM *t*-BuOOH-val kezeltük, majd 3000 fordulat perc^{-1} fordulatszámom 5 percig centrifugáltuk és kétszer mostuk fiziológias sóoldattal. A mintákat TE pufferban (372,2 mg l^{-1} EDTA, 1,21 g l^{-1} Tris, pH 7,0) vettük fel, 2 ml 10^6 db sejt ml^{-1} sejtszámú mintát 2 μM -os TMA-DPH oldattal jelöltünk 0,1%-ban, 5 percen keresztül, közben kétszer megkevertük. A mérést Perkin-Elmer fluoriméterrel végeztük, s az alkalmazott résszélesség 10 nm, a mérési excitációs hullámhossz 360 nm, az emissziós hullámhossz pedig 430 nm volt (Folmer és mtsai., 2008).

V.25. BY4741 és *erg5Δ* törzsek glicerín-asszimilációjának vizsgálata

A vizsgálat kivitelezése megegyezik a V.5. pontban leírt szaporodásgátlás vizsgálatával, azzal a különbséggel, hogy nem történt *t*-BuOOH kezelés. A kísérlethez négy különböző tápoldatot használtunk fel. Az első, a kontroll 2% glükózt tartalmazott. A másik három tápoldat glükóz helyett glicerint tartalmazott különböző koncentrációkban (1 mM, 10 mM, 100 mM). A fenti komponenseken kívül tartalmazták még a V.2. pontban leírt WO táptalaj további összetevőjét. A tenyészeteket 30 °C-on, 150 fordulat perc^{-1} fordulatszámom rázattuk és meghatározott időközönként mintát vettük és mértük az $\text{OD}_{595\text{-t}}$.

V.26. Statisztikai analízis

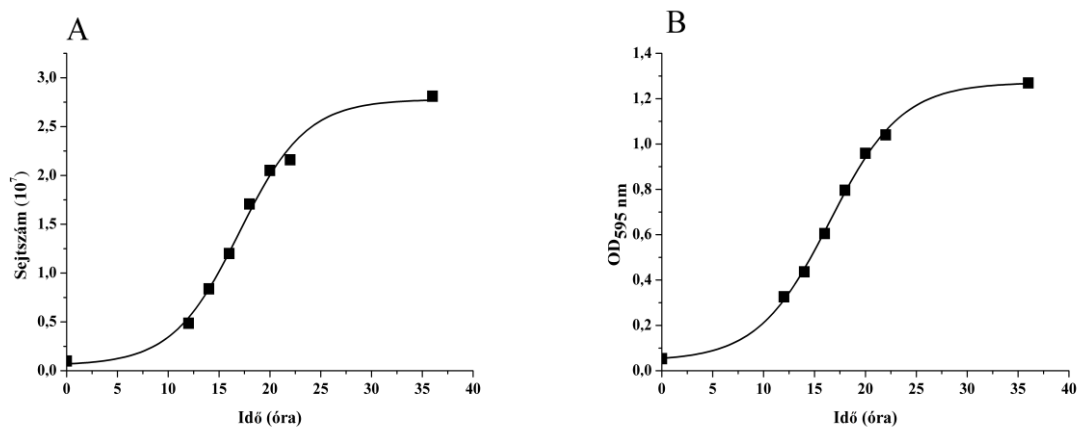
Kísérletei eredményeink legalább három független mérésből és azok három technikai ismétléséből származnak. Ha ettől bármilyen eltérés történt, akkor az külön jelzésre kerül. A statisztikai analízis a kétmintás, Student t-próba segítségével történt. A \pm érték a szórást, és nem a standard hibát jelöli. Ahol nem tüntettünk fel szórás értéket, ott reprezentatív eredményről van szó.

VI. Eredmények

VI.1. A CTN-nel végzett kísérletek eredményei

VI.1.1. *S. pombe* növekedési görbéjének felvétele

További kísérleteink tervezéséhez, illetve a használt törzs jellemzéséhez első lépésként megállapítottuk a *S. pombe* generációs idejét. Bürker-kamrás sejtszámolást követően, felhasználva az V.3. fejezetben bemutatott képletet, a generációs idő 3,1 órának adódott. Annak érdekében, hogy a további kísérletek során hasonló fiziológiás állapotú tenyészetet használjunk, meghatároztuk, hogy a dinamikusan osztódó tenyészetünk mikor található a közép-logaritmikus fázisban. Ez $OD_{595} = 0,05$ tenyészet indítása esetén kb. 16 óra volt (8. ábra).

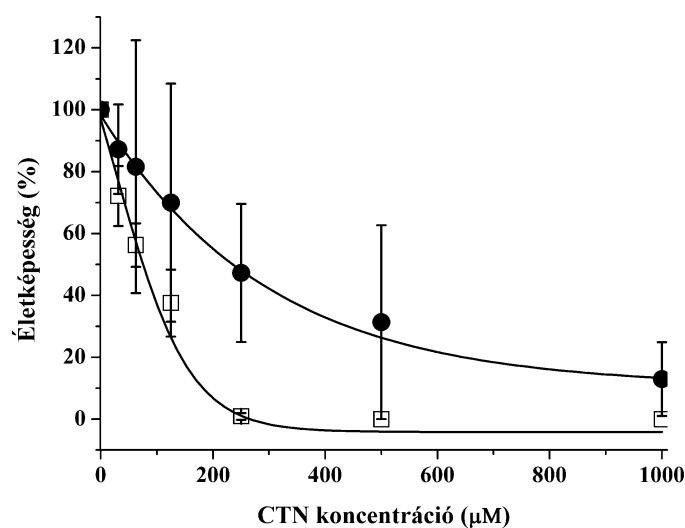


8. ábra. *S. pombe* tenyészetének szaporodási görbéje a sejtszám (A) és az 595 nm-en mért optikai denzitás (B) alapján (reprezentatív eredmény).

VI.1.2. A CTN citotoxicitás pH-függésének vizsgálata

A CTN citotoxicitásának vizsgálatához meghatároztuk a *S. pombe* sejtek pH-függő életképességét a standard mikrodilúciós módszerrel SM tápoldatban 5×10^3 induló sejtszámot alkalmazva. A CTN citotoxikus hatása erős pH-függést mutatott, pH = 4,5-en a CTN $MIC_{90} = 175 \mu\text{M}$ volt; pH = 6,0-on a CTN $MIC_{90} = 1000 \mu\text{M}$ volt 48 órás kezelést követően (9. ábra). A *S. pombe* sejtek pH = 3,0-on és pH = 8,0-on már nem tudtak toxinmentes környezetben sem növekedni.

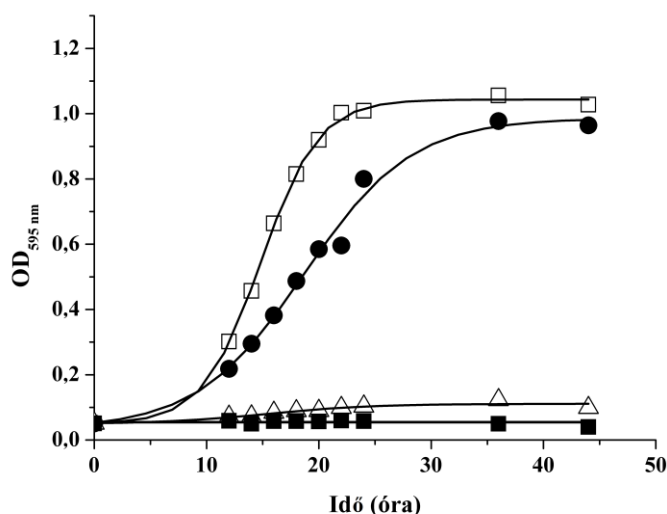
A kapott eredmény tükrében a további kísérleteket pH = 4,5-en végeztük, amely optimális a *S. pombe* sejtek növekedéséhez is.



9. ábra. A CTN citotoxikus hatása *S. pombe* 48 órás kezelést követően (□) pH = 4,5-en és (●) pH = 6,0-on, a standard mikrodilúciós teszt alapján.

VI.1.3. Szaporodásgátlás vizsgálata

Meghatároztuk a CTN *S. pombe* sejtekre gyakorolt szaporodásgátló hatását 10^6 sejt ml⁻¹ induló sejtszámot alkalmazva. A kontroll tenyésztettel szemben, a 125 µM-os CTN kezelés kismértékben késleltette a *S. pombe* sejtek logaritmikus fázisba lépését, de a növekedés mértékét nem befolyásolta szignifikánsan. A sejtek generációs ideje kismértékű növekedést mutatott, 3,1 órától 4,1 órára emelkedett. A 250, illetve 500 µM-os CTN kezelés 90,4%-kal, illetve 96,1%-kal csökkentette a növekedést a 44 órás tenyésztés végéig (10. ábra).



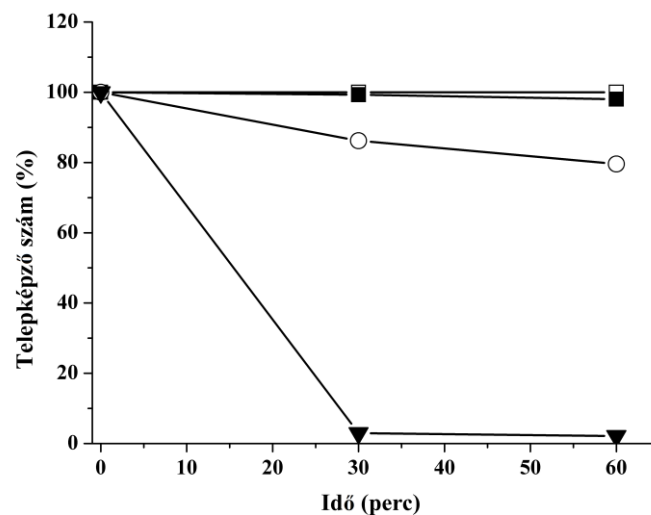
10. ábra. CTN-indukálta szaporodásgátlás *S. pombe* rázatott tenyésztetben (□: kontroll, ●: 125µM, Δ: 250 µM, ■: 500 µM CTN) (reprezentatív eredmény).

VI.1.4. Pusztítási görbe felvétele

A *S. pombe* tenyészetét különböző koncentrációjú CTN oldatokkal kezelve (10^7 db sejt ml^{-1}) vizsgáltuk a telepképző szám alakulását az idő függvényében. A kontroll tenyészet telepképző számát 100%-nak vettük és a kezelések során elpusztult sejteket ehhez viszonyítottuk. Az 500 μM CTN kezelés 2%-os pusztulást, az 1000 μM -os kezelés 21%-os pusztulást, míg a 2000 μM -os kezelés 98%-os pusztulást eredményezett (11. ábra).

Megemlítendő, hogy amikor hosszabb idejű kezelést alkalmaztunk (6 óra) 1000 μM CTN esetében, akkor a telepképző szám mindössze 4,8% volt (nincs megjelenítve).

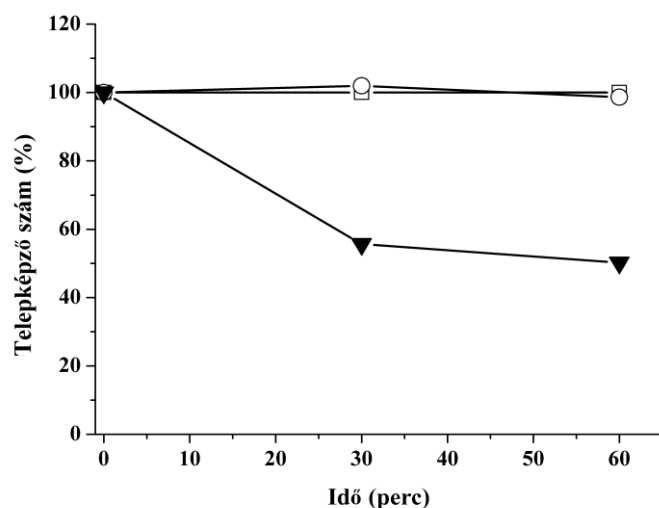
A további kísérletekhez használandó szubinhibitorikus koncentrációt 1000 μM -ban állapítottuk meg.



11. ábra. *S. pombe* telepképző sejtjeinek száma 0 μM (□), 500 μM (■), 1000 μM (○) és 2000 μM (▼) CTN kezelést követően (reprezentatív eredmény).

VI.1.5. Adaptáció vizsgálata

Az V.13. pontban bemutatott szaporodásgátlási kísérlet bizonyos mértékű adaptációs mechanizmust feltételez, mivel a 125 μM CTN kezelés bár megnyújtotta a generációs időt, de a tenyésztési időszak végére közel ugyanazt a sejtkoncentrációt el tudta érni a *S. pombe* tenyészet (10. ábra). Az 1000 μM -os, egy órás CTN előkezelés eredményeként a sejtek pusztulása ismételt kezelést követően 21%-ról 2%-ra csökkent 1000 μM esetén, 98%-ról pedig 50%-ra 2000 μM esetén (12. ábra).

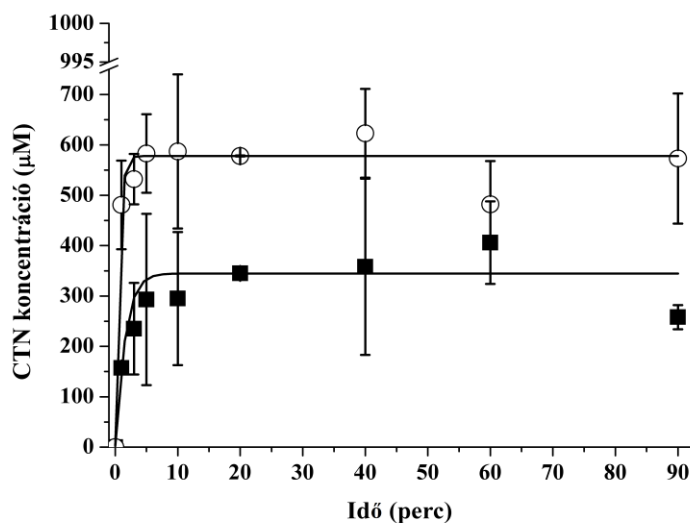


12. ábra. *S. pombe* teleképző sejtjeinek száma 1 óráig, 1000 μM-os CTN előkezelést követő újbóli kezelés után (□: kontroll, ○: 1000 μM, ▼: 2000 μM CTN) (reprezentatív eredmény).

VI.1.6. A CTN felvétel-kinetikájának meghatározása

Ozmotikusan stabilizált, 0,6 M-os KCl oldatban, pH = 4,5-nél meghatároztuk, hogy a *S. pombe* (10^7 sejt ml⁻¹) sejtfales vegetatív sejtjei, illetve sejtfales nélküli protoplasztjai a kísérletekhez használt toxint milyen gyorsan veszik fel, illetve mennyi toxint vesznek fel (előkísérletünkben megállapítottuk, hogy az alkalmazott CTN koncentráció nem okoz sem lízist, sem pedig zsugorodást a protoplasztokon).

A vegetatív sejtjei a toxin 30%-át vették fel 20 perc alatt, a protoplasztok pedig 58%-át 5 perc alatt (13. ábra).



13. ábra. *S. pombe* sejtfales vegetatív sejtjei (■) és sejtfales nélküli protoplasztjai (○) által felvett CTN mennyiségének meghatározása.

VI.1.7. Intracelluláris reaktív oxigén-fajták mérése

Közép-logaritmikus fázisban lévő tenyészeteket használva (10^7 sejt ml^{-1}) 60 perces 1000 μM CTN és 200 μM H_2O_2 (pozitív kontroll) kezelést követően fluorimetriás, illetve EPR-es mérések segítségével meghatároztuk a totál ROS, a $\text{O}_2^{\bullet-}$, a peroxidok, a $\bullet\text{OH}$ és a Cr(V) intracelluláris mennyiségét (2.táblázat). A kontrollhoz viszonyítva, 1000 μM -os CTN kezelés szignifikánsan ($p < 1\%$) megemelte az össz ROS szintet és a peroxidok szintjét, de a $\text{O}_2^{\bullet-}$, a $\bullet\text{OH}$ és a Cr(V) esetén nem tapasztaltunk változást. A $\bullet\text{OH}$ és a Cr(V) mérés egy mesterséges rendszer, ahol magas átmeneti fém koncentráció mellett [Cr(VI)], a Cr(VI)-redukáló kapacitását, illetve az $\bullet\text{OH}$ -termelő képességét mérjük a sejteknek. A H_2O_2 kezelés hasonló ROS profilt eredményezett, hasonló mértékű emelkedést mutatott mind az össz ROS szint, mind pedig a peroxidok szintje. Mindezek mellett a $\bullet\text{OH}$ szint szignifikánsan lecsökkent (2. táblázat).

Minta	Össz ROS ^a	$\text{O}_2^{\bullet-}$ ^b	Peroxidok ^c	PBN- $\bullet\text{OH}$ ^d	Cr(V) ^d
Kontroll	16,66±4,16	12,89±2,41	0,25±0,01	1,23±0,16	14,20±3,69
1000 μM CTN	34,83±3,66**	8,92±1,46	0,38±0,05**	0,96±0,23	9,76±1,96
200 μM H_2O_2	31,50±1,83**	12,97±2,66	0,44±0,05**	0,47±0,13***	12,53±1,83

2. táblázat. Intracelluláris totál ROS, $\text{O}_2^{\bullet-}$, peroxid, PBN- $\bullet\text{OH}$ és Cr(V) koncentrációk 1 óras, 1000 μM -os CTN, illetve 200 μM -os H_2O_2 kezelés hatására, *S. pombe* sejtekben. ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$, a Student *t*-teszt alapján számolva.

^a Koncentráció nM DCF (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

^b Koncentráció nM etídium-bromid (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

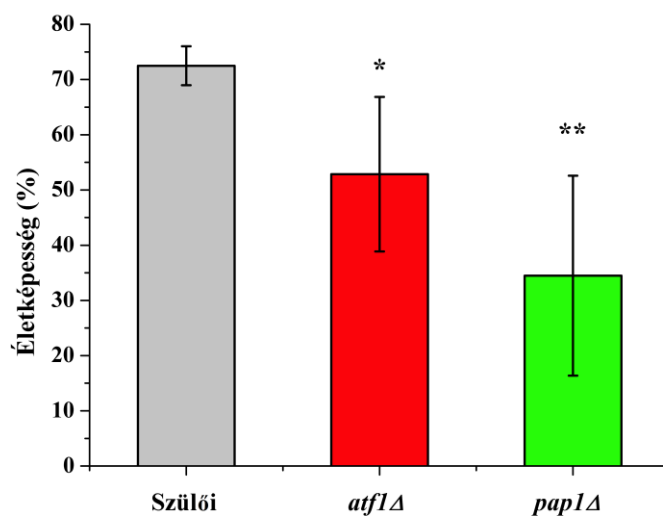
^c Koncentráció nM rodamin (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

^d Koncentráció μM nitroxid szabadgyök (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

VI.1.8. *S. pombe* jelátviteli mutánsok tesztje

S. pombe-ban mind a külső, mind pedig a belső stresszhatások a MAPK útvonalon keresztül regulálódnak. A mikrodilúciós módszer segítségével meghatároztuk a CTN növekedést gátló koncentrációját 0-1000 μM -os tartományban a *S. pombe* (5×10^3 sejt ml^{-1}) szülői törzsén, illetve annak transzkripciós faktor deléció mutáns *pap1* Δ és *atf1* Δ törzsein. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, 250 μM CTN 47,1%-os növekedésgátlást okozott az *atf1* Δ törzs esetében és 65,5% gátlást a *pap1* Δ törzs esetében (14. ábra).

Mindezek alapján a CTN-indukálta stresszfolyamat elsősorban a Pap1 transzkripciós faktoron keresztül szabályozódik, a megnövekedett érzékenység alapján; de az Atf1-es faktor aktivációja is szükséges, hogy a sejt szabályozni tudja a CTN-indukálta oxidatív stresszfolyamatokat.



14. ábra. *S. pombe* szülői, *atf1Δ* és *pap1Δ* deléciós mutáns törzseinek életképessége (a kezeletlen szülői %-ában) 250 μ M CTN kezelést követően, a standard mikrodilúciós teszt alapján. * $p < 5\%$; ** $p < 1\%$, a Student *t*-teszt alapján számolva.

VI.1.9. Az antioxidáns védelmi rendszer aktivitásának vizsgálata

A megnövekedett intracelluláris ROS-ok mennyiségére reagálva (2. táblázat), az adaptációs mechanizmusnak köszönhetően (12. ábra), a Pap1 és Atf1 transzkripciós faktorok közreműködésével (14. ábra) egy komplex regulációs folyamatot sikerül megfigyelnünk az antioxidáns rendszer szintjén. A kontroll sejtekhez viszonyítva, a 60 perces, 1000 μ M-os CTN kezelés hatására mintegy háromszorosára emelkedett a GSH- és kétszeresére a GSSG-tartalom. Ezt a változást követte a GSH homeosztázisért felelős enzimek aktivitása is. Szignifikáns növekedést tapasztaltunk a GPx (31%), a G6PD (36%) és a GST (40%) specifikus aktivitásban, 38-38% csökkenést a GR és a CAT specifikus aktivitásban, az össz SOD, a SOD_{Mn} és a SOD_{CuZn} aktivitása pedig nem változott (3. táblázat). Érdeemes megemlíteni, hogy a GSH-tartalom már 15 perces kezelés után is 80%-kal megemelkedett. Ha pedig 6 órán át kezeltük a tenyészetünket, akkor a GSH tartalomban 90%-os csökkenését tapasztaltunk (4,8% telepképző szám mellett) (nincs megjelenítve).

Bár hasonló ROS profilt tapasztaltunk a H₂O₂-val történő kezelés után (2 táblázat), az antioxidáns rendszer aktivitása mégis jelentős eltérést mutatott. 22,1%-os csökkenést tapasztaltunk a GSH-tartalomban, szignifikánsan megemelkedett a G6PD, a GST specifikus aktivitása és a H₂O₂ semlegesítésért felelős CAT specifikus aktivitása valamint szignifikánsan lecsökkent az össz SOD, a SOD_{Mn}, a SOD_{CuZn} és a GR specifikus aktivitása. A GSSG-tartalom, illetve a GPx specifikus aktivitása nem változott (3. táblázat).

	Kontroll	CTN	H ₂ O ₂
GSH ^a	98,82±14,49	299,21±49,34***	77,01±3,78*
GSSG ^a	4,47±2,14	10,46±1,08**	5,38±0,29
GSH/GSSG	29,44±15,71	27,54±1,31	13,34±2,83
Tiolok ^b	140,45±6,32	103,85±5,63***	100,17±9,02***
Össz SOD ^c	14,05±2,57	10,85±2,68	6,44±1,18**
SOD _{Mn} ^c	4,18±0,80	4,59±1,09	2,29±0,53*
SOD _{CuZn} ^c	9,87±2,03	6,25±1,88	4,14±1,57**
CAT ^d	4,31±0,59	2,68±0,58*	18,57±2,52***
GPx ^e	2,91±0,26	3,83±0,57*	2,93±0,29
GR ^e	63,66±6,02	39,56±2,12***	51,69±2,51*
G6PD ^e	149,93±26,74	203,79±12,78*	200,96±17,64*
GST ^e	9,57±1,75	13,38±0,83*	13,18±1,16*

3. táblázat. GSH, GSSG és tiol tartalom, valamint specifikus SOD, CAT, GPx, GR, G6PD és GST koncentrációk 1000 μ M CTN-nel vagy 200 μ M H₂O₂-val, 1 órán keresztül kezelt *S. pombe* sejtekben. * p <5%; ** p <1%; *** p <0,1%, a Student t -teszt alapján számolva.

^a Tartalom μ M (mg fehérje)⁻¹-ben megadva

^b Tartalom nM (mg fehérje)⁻¹-ben megadva

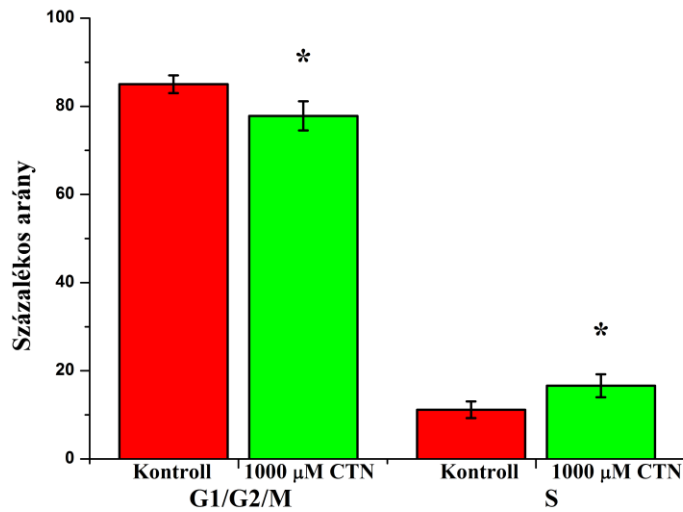
^c Specifikus egység (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

^d Specifikus aktivitás μ M (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

^e Specifikus aktivitás nM (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

VI.1.10. A CTN sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata

A CTN sejtciklusra gyakorolt hatását a DNS tartalom mérésével vizsgáltuk, áramlási citométer segítségével. Az egy órás, szubinhitorikus CTN kezelés hatására a sejtciklus G1/G2/M-fázisában tartózkodó sejtek száma 85,01±2,00 %-ról 77,82±3,30 %-ra csökkent a G2/M-fázisblokknak köszönhetően. Ezzel párhuzamosan, az S-fázisú sejtek száma 11,18±1,91 %-ról 16,62±2,60 %-ra emelkedett (15. ábra). Mindezek alapján feltételezhető a sejtciklus G2/M-fázisblokkja.

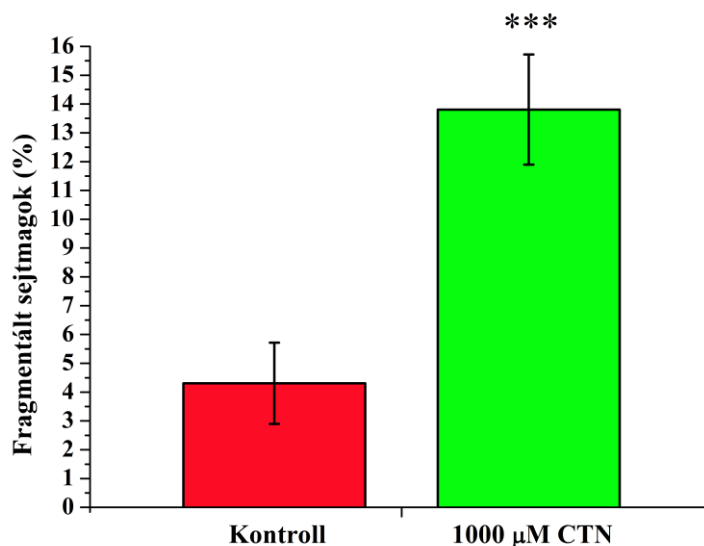


15 ábra. *S. pombe* kezeletlen (■) és 1000 μM CTN-nel (■) kezelt sejtjeinek százalékos megoszlása a sejtciklus G1/G2/M-és S-fázisaiban. * $p < 5\%$, a Student *t*-teszt alapján számolva.

VI.1.11. *S. pombe* sejtmag morfológiájának vizsgálata

A sejtciklusban bekövetkezett blokk feltételez bizonyos mértékű DNS károsodást, amit fluoreszcens mikroszkópiával ellenőriztünk DAPI-val festett sejteken. Eredményeink 300 sejt sejtmagjának vizsgálatából származnak.

Az egy órás, 1000 μM-os CTN kezelés 3,2-szeres növekedést eredményezett a fragmentált sejtmagok számában, a kontrollhoz viszonyítva (16. ábra).



16. ábra. A CTN sejtmag morfológiára gyakorolt hatása kontroll és 1000 μM CTN-nel kezelt *S. pombe* sejteken. *** $p < 0,1\%$, a Student *t*-teszt alapján számolva.

VI.2. *t*-BuOOH-val végzett kísérletek eredményei

VI.2.1. Az *erg5Δ* mutáns antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata

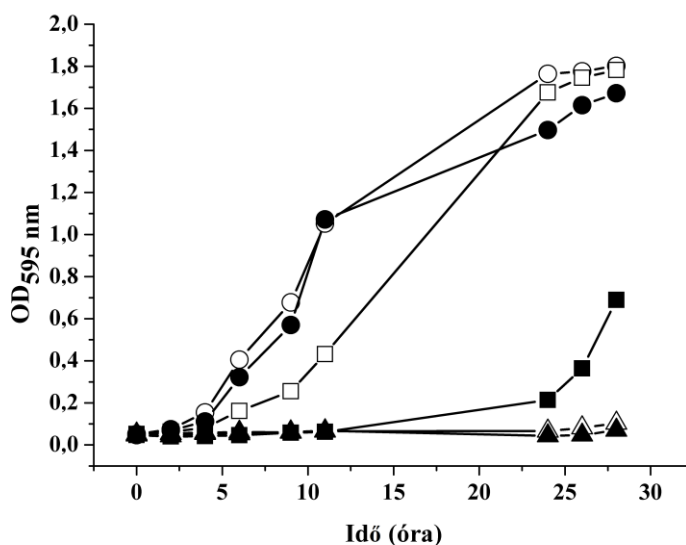
Vizsgálatunkat *S. cerevisiae* több törzsével kezdtük (*erg2Δ*, *4Δ*, *5Δ* és *6Δ*). Első lépésként WO táptalajon foltoltással meghatároztuk a törzsek érzékenységét (MIC) oxidatív stresszorokra, illetve amfotericin B-re. A szülői BY4741-es törzshöz viszonyítva, a deléciós mutánsok szignifikánsan magasabb (20-540%) MIC értéket mutattak amfotericin B-re. Meglepetésünkre a mutáns törzsek eltérő érzékenységet, illetve rezisztenciát mutattak az alkalmazott oxidatív stresszorokkal szemben úgy, mint *t*-BuOOH-ra, a H₂O₂-ra, a menadionra (O₂^{•-}-t generáló ágens), a Cd²⁺-ra (GSH kiürülést okoz) és Cr(VI)-ra (GSH kiürülést okoz és [•]OH-t indukál). Az *erg5Δ* mutáns bizonyult legérzékenyebbnek *t*-BuOOH-ra és legtoleránsabbnak amfotericin B-re (4. táblázat). Ennek alapján ezt a törzset választottuk ki a további munkára.

	BY4741	<i>erg2Δ</i>	<i>erg4Δ</i>	<i>erg5Δ</i>	<i>erg6Δ</i>
Amfotericin B (μg ml ⁻¹)	1,25	1,5	1,5	8	1,75
<i>t</i> -BuOOH (mM)	1,25	0,75	0,75	0,5	1,25
H ₂ O ₂ (mM)	3	5	3	3	5
Menadion (mM)	0,175	0,15	0,25	0,175	0,15
CdCl ₂ (μM)	200	350	300	350	350
Cr(VI) (μM)	300	250	225	225	275

4. táblázat. Az amfotericin B és oxidatív stresszorok MIC értékei *S. cerevisiae* szülői törzsén, illetve annak ergoszterin mutáns ERG2-6 törzsein, foltoltással meghatározva (reprezentatív eredmény).

VI.2.2. Szaporodásgátlás vizsgálata

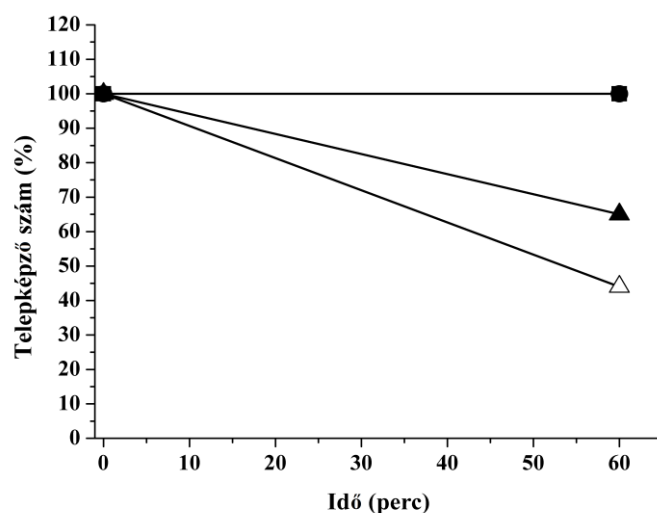
Az *erg5Δ* mutáns törzs szülői törzshöz viszonyított *t*-BuOOH-val szembeni 2,5-szeres érzékenységét (4. táblázat) jól demonstrálta a két törzs, különböző *t*-BuOOH koncentrációkra felvett szaporodási görbéje (17. ábra). 0,4 mM *t*-BuOOH jelenlétében az *erg5Δ* mutáns mintegy 15 órával később lépett az exponenciális növekedési fázisba és 50%-kal kisebb sejttömeg elérésére volt csak képes a 27 órás tenyésztési időszak végéig. A 0,6 mM-os *t*-BuOOH kezelés mindkét törzs növekedését teljes mértékben gátolta (17. ábra).



17. ábra. *S. cerevisiae* BY4741 szülői (üres szimbólumok) és annak ergoszterin mutáns *erg5Δ* törzsének (teli szimbólumok) szaporodásgátlása különböző koncentrációjú *t*-BuOOH-val (○/●: kontroll, □/■: 0,4 mM, △/▲: 0,6 mM *t*-BuOOH) (reprezentatív eredmény).

VI.2.3. Pusztítási görbe felvétele

Különböző koncentrációjú *t*-BuOOH oldatokkal kezelve a *S. cerevisiae* BY4741 szülői és *erg5Δ* mutáns tenyészeteket ($2,5 \times 10^7$ db sejt ml⁻¹), vizsgáltuk a telepképző szám alakulását 60 perc kezelést követően. A kontroll tenyészet telepképző számát 100%-nak vettük és a kezelések során elpusztult sejteket ehhez viszonyítottuk. Az 1 mM-os *t*-BuOOH kezelés egyik törzs esetében sem okozott sejtpusztulást, 2 mM pedig 56%-os csökkenést eredményezett a szülői törzs telepképző számában és 35%-os csökkenést az *erg5Δ* mutáns telepképző számában (18. ábra). Mivel a 2 mM-os koncentráció az egyik törzs esetében a sejtek több mint 50%-át elpusztította, ezért a további kísérletekhez használandó szubinhibitorikus koncentrációt 1 mM-ban állapítottuk meg annak ellenére, hogy nem tapasztaltunk csökkenést a telepképző számban egyik törzs esetében sem.



18. ábra. *S. cerevisiae* BY4741 szülői (üres szimbólumok) és annak ergoszterin mutáns *erg5Δ* törzsének (teli szimbólumok) telepképző sejtszáma 0 mM (○/●), 1 mM (□/■), 2 mM (△/▲) *t*-BuOOH kezelést követően (reprezentatív eredmény).

VI.2.4. BY4741 és *erg5Δ* törzsek szterin-analízise

A BY4741 és az *erg5Δ* mutáns törzs szterin-összetétele látható az 5. táblázatban, a *t*-BuOOH-val nem kezelt kontroll, illetve 5 órás, 1 mM-os *t*-BuOOH kezelést követően.

A *t*-BuOOH kezeletlen szülői törzshöz viszonyítva az *erg5Δ* törzset, az *ERG5* gén deléciójának hatására az ergoszterin teljes hiánya (58,1%-ról 0%-ra), illetve az intermedier szterinek felhalmozódása (pl.: ergosta-5,7-dienol 8,2%-ról 83,5%-ra) figyelhető meg. A fő plazmamembrán rigidizáló ergoszterin kiesését a sejtek túlkompenzálták, ami abban nyilvánult meg, hogy az össz szterin tartalom 49,8%-kal megemelkedett az *erg5Δ* törzsnél.

t-BuOOH kezelés hatására (5 óra) mind a szülői, mind pedig a mutáns törzs szterin-mintázatában szignifikáns változások mentek végbe. Az ergoszterin szint 58,1%-ról 65,0%-ra emelkedett a szülői törzsben, a szerepét átvevő ergosta-5,7-dienol pedig 85,5%-ról 89,5%-ra a mutánsban. A szkvalén, a zimoszterin, a fekoszterin és episzterin szint, illetve az össz szterin tartalom csökkent mindkét törzsben (5. táblázat).

Szterinek	Kontroll		<i>t</i> -BuOOH-kezelt	
	BY4741	<i>erg5Δ</i>	BY4741	<i>erg5Δ</i>
Szkvalén	14,0	3,8 ^{###}	6,5 ^{***}	0,5 ⁺⁺⁺
Zimoszterin	5,7	4,1 ^{##}	4,0 ^{**}	3,0 ⁺⁺
Ergoszterin	58,1	n.d. ^{###}	65,0 [*]	n.d.
Fekoszterin	n.d.	1,3 ^{###}	n.d.	1,0 ⁺⁺
Ergosta-5,7-dienol	8,2	83,5 ^{###}	8,6	89,5 ⁺
Episzterin	2,8	n.d. ^{###}	2,6 [*]	n.d.
Lanoszterin	5,6	5,0 [#]	7,3 ^{**}	3,1 ⁺⁺
4,4-Dimetilzimoszterin	1,9	0,4 ^{###}	2,3 ^{**}	0,7 ⁺⁺
24-Metilén-24,25-Dihidrolanoszterin	0,2	n.d. ^{###}	0,2	n.d.
Azonosítatlan	3,5	1,9 ^{##}	3,4	2,2 ⁺⁺
Össz szterin ^a	32,9±4,4	49,3±1 ^{###}	9,6±0,1 ^{***}	15,4±4,2 ⁺⁺⁺

5. táblázat. *S. cerevisiae* BY4741 szülői és annak ergoszterin mutáns *erg5Δ* törzsének szterin tartalma (az össz szterin tartalom %-ában) kontroll állapotban, illetve 5 órás, 1 mM-os *t*-BuOOH kezelést követően (reprezentatív eredmény).

^a Specifikus koncentrációμM ergoszterin (mg szárzottömeg)⁻¹-ben megadva

n.d. – nem detektált

Szignifikancia: #,*,+5-15% különbség; ##,**,++15-100% különbség; ###,***,+++ > 100% különbség.

A össz szterin esetén a szignifikancia: #,*,+ $p < 5\%$; ##,**,++ $p < 1\%$; ###,***,+++ $p < 0,1\%$, a Student *t*-teszt alapján számolva.

A szignifikáns különbségek az alábbiak között lettek számolva:

- (i) # BY4741 és *erg5Δ* kontroll sejtjei között;
- (ii) *BY4741 törzs kezeletlen és *t*-BuOOH-kezelt sejtjei között;
- (iii) +*erg5Δ* törzs kezeletlen és *t*-BuOOH-kezelt sejtjei között.

VI.2.5. BY4741 és *erg5Δ* törzsek zsírsav-analízise

Az vizsgált *S. cerevisiae* törzsek teljes zsírsav-összetétele (TFAs), poláris lipidek zsírsav-összetétele (PLFAs, beleértve a foszfolipidek zsírsavait), triacil-glicerol zsírsav-összetétele (TAGFAs), és szabad zsírsav-összetétele (FFAs), valamint a telítetlen (USFA)/telített (SFA) és többszörösen telítetlen (PUFA)/telített zsírsavak aránya látható a 6. A-E táblázatokban. *S. cerevisiae*-ben a fő zsírsavak a palmitinsav (16:0, 16,2-24,6%), a palmitoleinsav (16:1-9c, 3,3-46,6%), a sztearinsav (18:0, 4,2-9,2%), és az oleinsav (18:1-9c, 19,5-56,1%), aminek alapján a törzs zsírsav összetételét az USFA magas aránya jellemzi.

Az ergoszterin kiesését az *erg5Δ* mutáns sejtek elsősorban a PLFAs szintjén kompenzálták (az ergosta-5,7-dienol és az össz szterin tartalom megemelkedésén kívül, 5. táblázat). Az egyik fő, plazmamembrán rigiditást szabályozó zsírsavnak, a sztearinsavnak a koncentrációja mintegy 69%-kal megemelkedett (6. B táblázat), aminek a hatására megemelkedik a SFA tartalom, lecsökken az USFA, és az USFA/SFA (6. E táblázat).

A *t*-BuOOH kezelés hatására szignifikáns változás volt tapasztalható szinte mindegyik lipid-csoport esetén (6. A-D táblázat). A kezelt szülői törzsben 3,9-szeres növekedés volt

megfigyelhető a palmitinsav tartalomban és 2,5-szeres csökkenés az oleinsav tartalomban (6. *D táblázat*). Ennek következtében 85-86%-os csökkenést tapasztaltunk a FFAs USFA/SFA arányában. A PLFAs összetétel esetén hasonló változásokat tapasztaltunk, az USFA/SFA arány 15%-kal csökkent (6. *E táblázat*). Az *erg5Δ* mutáns esetében, a kezelés hatására a palmitoleinsav szint 1,15-szeresen megemelkedett a PLFAs esetén, 1,12-szeresen a TAGFAs esetén és 11,8-szeresen a FFAs esetén (6. *B-D táblázat*). Az USFA/SFA arány ellentétes változásokat mutatott a BY4741 törzshöz viszonyítva. A PLFAs összetételt illetően az USFA/SFA arány 1,41-szeresen megemelkedett, a FFAs esetében pedig 1,23-szeresre nőtt (6. *E táblázat*).

TFAs	Kontroll		<i>t</i> -BuOOH-kezelt	
	BY4741	<i>erg5Δ</i>	BY4741	<i>erg5Δ</i>
10:0	1,5	0,9 ##	1,5	1,1 ++
12:0	1,6	1,3 ##	1,8 *	1,6 ++
14:0	1,7	1,5 #	1,7	1,9 ++
14:1-9c	0,2	0,3 ##	0,3 **	0,4 ++
15:0	0,2	0,2	0,2	0,2
16:0	20,0	17,2 ##	20,1	16,5
16:1-9c	36,6	35,7	36,4	38,6 +
18:0	4,9	5,9 ##	5,5 *	4,6 ++
18:1-9c	25,9	28,4 #	24,5 *	26,6 +
18:1-11c	1,3	1,5 ##	1,4 *	1,6 +
18:2-9c,12c	5,1	6,1 ##	5,4 *	5,8 +
24:0	0,2	0,2	0,1 ***	0,1 +++

6. *A táblázat*. *S. cerevisiae* BY4741 és *erg5Δ* törzseinek TFAs összetétele 5 órás, 1 mM-os *t*-BuOOH kezelést követően (reprezentatív eredmény).

Rövidítések: c – *cisz*.

Szignifikancia: lásd az 5. táblázatnál.

PLFAs	Kontroll		<i>t</i> -BuOOH-kezelt	
	BY4741	<i>erg5Δ</i>	BY4741	<i>erg5Δ</i>
10:0	0,3	n.d. ###	0,5 **	0,3 +++
12:0	0,8	0,4 ###	0,9 *	0,7 ++
14:0	1,4	1,3 #	1,5 *	1,5 ++
14:1-9c	0,2	n.d. ###	0,3 **	0,4 +++
15:0	0,1	n.d. ###	n.d. ***	0,2 +++
16:0	20,7	21,6	23,3 *	17,0 ++
16:1-9c	46,6	44,6	46,0	51,3 ++
18:0	4,2	7,1 ##	4,7 *	4,1 ++
18:1-9c	23,5	22,1 #	19,7 **	21,7
18:1-11c	1,3	1,5 ##	1,5 **	1,7 +
18:2-9c,12c	0,03	n.d. ###	n.d. ***	n.d.

6. B táblázat. *S. cerevisiae* BY4741 és *erg5Δ* törzseinek PLFAs összetétele 5 órás, 1 mM-os *t*-BuOOH kezelést követően (reprezentatív eredmény).

Rövidítések: n.d. – nem detektált; c – *cisz.*

Szignifikancia: lásd az 5. táblázatnál.

TAGFAs	Kontroll		<i>t</i> -BuOOH-kezelt	
	BY4741	<i>erg5Δ</i>	BY4741	<i>erg5Δ</i>
10:0	3,8	2,3 ##	2,7 **	1,4 ++
12:0	2,0	0,8 ###	1,7 **	1,9 +++
14:0	3,3	3,0 #	3,1 *	3,3 +
14:1-9c	n.d.	n.d.	n.d.	0,6 +++
16:0	24,6	21,3 ##	25,5	21,0
16:1-9c	37,3	36,2	34,5 *	40,7 ++
18:0	5,4	7,3 ##	7,0 **	6,3 ++
18:1-9c	19,5	22,7 ##	20,0	21,4 +
18:1-11c	1,3	1,2 #	1,8 **	1,7 ++
18:2-9c,12c	1,2	0,9 ##	0,9 **	0,2 +++

6. C táblázat. *S. cerevisiae* BY4741 és *erg5Δ* törzseinek TAGFAs összetétele 5 órás, 1 mM-os *t*-BuOOH kezelést követően (reprezentatív eredmény).

Rövidítések: n.d. – nem detektált; c – *cisz.*

Szignifikancia: lásd az 5. táblázatnál.

FFAs	Kontroll		<i>t</i> -BuOOH-kezelt	
	BY4741	<i>erg5Δ</i>	BY4741	<i>erg5Δ</i>
14:0	n.d.	n.d.	0,5 ***	n.d.
16:0	16,2	16,5	63,8 ***	14,3 ++
16:1-9c	3,3	n.d. ###	0,5 ***	11,8 +++
18:0	9,2	8,2 #	5,5 **	6,9 ++
18:1-9c	56,1	60,6 #	22,6 ***	52,6 ++
18:2-9c,12c	15,2	14,7	7,1 ***	14,4

6. D táblázat. *S. cerevisiae* BY4741 és *erg5Δ* törzseinek FFAs összetétele 5 órás, 1 mM-os *t*-BuOOH kezelést követően (reprezentatív eredmény).

Rövidítések: n.d. – nem detektált; c – *cisz.*

Szignifikancia: lásd az 5. táblázatnál.

		Kontroll		<i>t</i> -BuOOH-kezelt			
		BY4741	<i>erg5Δ</i>	BY4741	<i>erg5Δ</i>		
TFAs	SFA	30,1	27,1 #	31,0		25,9	
	USFA	69,1	72,0	68,0		73,0	
	USFA/SFA	2,3	2,7 ##	2,2		2,8	+
	PUFA/SFA	0,2	0,2	0,2		0,2	
	Ismeretlen	0,8	0,9 *	1,0 **		1,1	++
PLFAs	SFA	27,6	30,3 #	30,9 *		23,8	++
	USFA	71,7	68,2 #	67,6 *		75,1	+
	USFA/SFA	2,6	2,2 ##	2,2 **		3,1	++
	PUFA/SFA	0,001	n.d. ***	n.d. ***		n.d.	
	Ismeretlen	0,7	1,5 ###	1,5 ***		1,1	++
TAGFAs	SFA	39,0	34,8 #	40,0		33,9	
	USFA	59,3	61,1	57,2		64,7	+
	USFA/SFA	1,5	1,8 ##	1,4 *		1,9	+
	PUFA/SFA	0,03	0,03	0,02 **		0,007	+++
	Ismeretlen	1,6	4,1 ###	2,9 **		1,4	+++
FFAs	SFA	25,4	24,8	69,8 ***		21,2	++
	USFA	74,6	75,2	30,2 ***		78,8	
	USFA/SFA	2,9	3,0	0,4 ***		3,7	++
	PUFA/SFA	0,6	0,6	0,1 ***		0,7	++
	Ismeretlen	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	

6. E táblázat. USFA)/SFA zsírsavak aránya a *S. cerevisiae* BY4741 és *erg5Δ* kontroll, illetve 5 órán keresztül 1 mM *t*-BuOOH-val kezelt törzseiben (reprezentatív eredmény).

Rövidítések: n.d. – nem detektált; c – *cisz.*

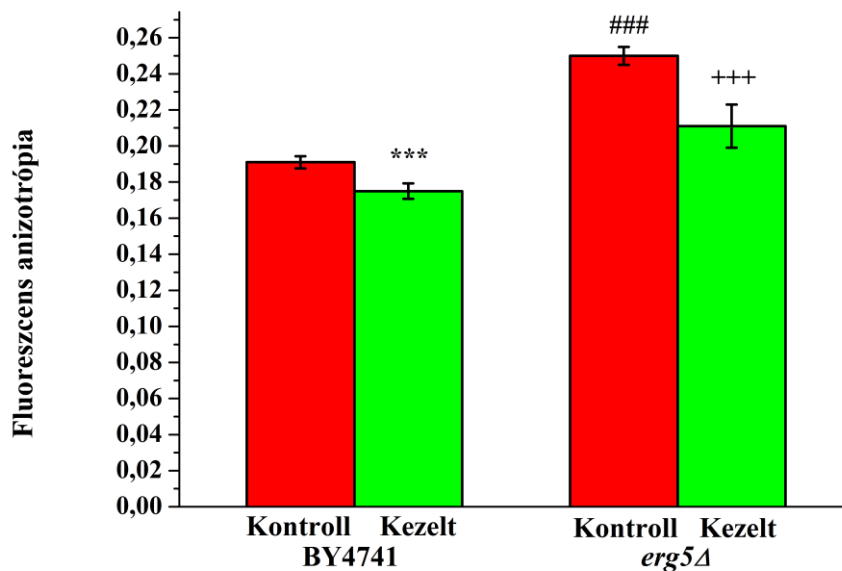
Szignifikancia: lásd az 5. táblázatnál.

VI.2.6. Fluoreszcens anizotrópia meghatározása

Felmerült a kérdés, hogy a plazmamembrán lipid-komponenseinek összetételében bekövetkezett változások hogyan befolyásolták a membrán biofizikai paramétereit. Ehhez megmértük a plazmamembrán fluiditását, annak anizotrópia-változását a TMA-DPH fluoreszcens polarizációs próba segítségével.

A *t*-BuOOH-val nem kezelt fluoreszcens anizotrópia értéke szignifikánsan magasabb volt az *erg5Δ* mutáns esetében ($r=0,250\pm 0,005$), szemben az BY4741 szülői törzssel ($r = 0,191\pm 0,0034$) (19. ábra). A megnövekedett *r*-érték, a megnövekedett anizotrópia alapján megnövekedett a plazmamembrán rigiditása. Mivel zsírsav szinten csak kismértékű változásokat tapasztaltunk, és azt is csak a PLFAs összetételben (6. B táblázat), így az *erg5Δ* törzsnél tapasztalt megnövekedett membránrigiditás háttérében a szterin-bioszintézis felborulása, túlkompensálása áll (5. táblázat).

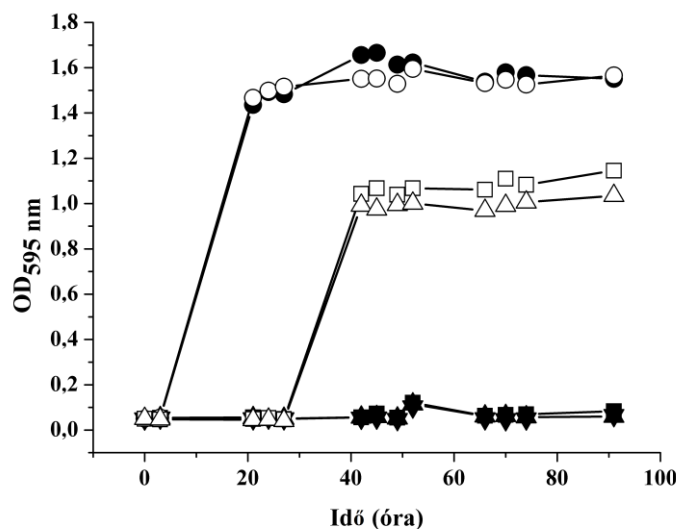
Az *t*-BuOOH kezelés (egy óras, 1 mM-os *t*-BuOOH) hatására mindkét törzs esetében csökkent a plazmamembrán anizotrópiája, a megnövekedett membrán-fluiditás eredményeként. A kezelt BY4741 törzs *r*-értéke: $0,191\pm 0,0034$ -ről $0,175\pm 0,0043$ -ra, az *erg5Δ* törzsé pedig $0,250\pm 0,005$ -ről $0,211\pm 0,012$ -re csökkent (19. ábra).



19. ábra. TMA-DPH fluoreszcens anizotrópia kontroll (üres oszlopok) és 1 mM *t*-BuOOH-kezelt (fekete oszlopok) *S. cerevisiae* BY4741 és *erg5Δ* sejtjeiben. ###,***,+++ $p < 0,1\%$, a Student *t*-teszt alapján számolva. Szignifikáns különbségek: lásd az 5. táblázatnál.

VI.2.7. BY4741 és *erg5Δ* törzsek glicerín-asszimilációjának vizsgálata

Az *erg5Δ* törzs plazmamembrán összetételében bekövetkezett szignifikáns változások (6. A-E táblázatok), valamint az r -érték szignifikáns növekedése (19. ábra) felvetette a plazmamembrán biológiai funkciójának a megváltozásának esélyét. Ennek alátámasztására megvizsgáltuk a BY4741 és *erg5Δ* törzsek glicerín-asszimilációját. A két törzset összehasonlítva, nem tapasztaltunk különbséget a törzsek növekedésében glükóz mellett. A glükózt tartalmazó médiumhoz viszonyítva, a BY4741 törzs 22 órával később lépett a logaritmusos fázisba, illetve a biomassza 40%-kal kevesebb volt 10 vagy 100 mM glicerín jelenlétében. Ezek mellett a feltételek mellett az *erg5Δ* törzs nem volt képes növekedni (20. ábra), 1000 mM glicerín jelenlétében pedig 13% növekedést tapasztaltunk (nincs megjelenítve).



20. ábra. *S. cerevisiae* BY4741 (üres szimbólumok) és *erg5Δ* (teli szimbólumok) törzseinek növekedése különböző glicerín koncentrációk mellett. A sejtek WO tápoldatban nőttek kiegészítve glükózzal (○/●), 100 mM glicerinnel (□/■) vagy 10 mM glicerinnel (△/▲) (reprezentatív eredmény).

VI.2.8. Intracelluláris reaktív oxigén-fajták mérése

Áramlási citometriás, illetve EPR-es mérések segítségével meghatároztuk a $O_2^{\bullet-}$, a peroxidok, a $\bullet OH$ és a Cr(V) intracelluláris mennyiségét.

A kontroll törzseknél, a BY4741-es szülői törzshöz viszonyítva, az intracelluláris $O_2^{\bullet-}$ (37%-kal) és a peroxidok (11%-kal) koncentrációja szignifikánsan lecsökkent a Cr(VI) hozzáadását követően megemelkedett mind a $\bullet OH$, mind pedig a Cr(V) koncentráció az *erg5Δ* törzsben (7. táblázat).

A *t*-BuOOH-kezelt törzsek esetében, viszonyítva a kezeletlenekhez, a BY4741 törzsnél, 6,6-szeres növekedést tapasztaltunk a $O_2^{\bullet-}$ koncentrációban és 6,8-szeres növekedést a peroxidok koncentrációjában. Az *erg5Δ* törzsből a kezelés 2,4-szeres emelkedést idézett elő a $O_2^{\bullet-}$ koncentrációban és 3,2-szeres növekedést a peroxidok koncentrációjában. Az BY4741 kezelt törzsében, a kontrollhoz viszonyítva 49%-kal emelkedett a $\bullet OH$ és 38%-kal a Cr(V) koncentráció. Az *erg5Δ* törzsből a kezelés 34% csökkenést indukált a $\bullet OH$ koncentrációban, és 35%-t Cr(V) koncentrációban (7. táblázat).

Reaktív gyök	Kontroll		<i>t</i> -BuOOH-kezelt	
	BY4741	<i>erg5Δ</i>	BY4741	<i>erg5Δ</i>
$O_2^{\bullet-a}$	106,98 ± 14,3	67,4 ± 6,02 ^{###}	713 ± 47,2 ^{***}	160 ± 17,9 ⁺⁺⁺
Peroxidok ^a	42,6 ± 1,24	38,04 ± 1,7 ^{###}	290,5 ± 32,1 ^{***}	120,1 ± 7,63 ⁺⁺⁺
PBN- $\bullet OH^b$	9,39 ± 1,18	18,2 ± 1,95 ^{###}	14,01 ± 1,94 ^{**}	12,1 ± 1,78 ⁺⁺
Cr(V) ^b	55 ± 5,2	119,1 ± 1,1 ^{###}	76,05 ± 9,97 [*]	77,6 ± 4,9 ⁺⁺⁺

7. táblázat. Intracelluláris $O_2^{\bullet-}$, peroxid, PBN- $\bullet OH$ és Cr(V) koncentrációk 1 óras, 1 mM-os *t*-BuOOH kezelés hatására, *S. cerevisiae* BY4741 és *erg5Δ* sejtjeiben. [#].*⁺ $p < 5\%$; ^{##}.*^{*,++} $p < 1\%$; ^{###}.*^{*,+++} $p < 0,1\%$, a Student *t*-teszt alapján számolva. A szignifikáns különbségeket lásd az 5. táblázatnál.

^a Fluoreszcens intenzitás (a.u.)

^b Koncentráció μM nitroxid szabadgyök (mg fehérje)⁻¹-ben megadva.

VI.2.9. Az antioxidáns védelmi rendszer aktivitásának vizsgálata

Az *erg5Δ* törzsből a BY4741-es szülői törzshöz viszonyítva szignifikáns növekedést tapasztaltunk a SOD_{Mn}, a CAT és a GST specifikus aktivitásában, továbbá megemelkedett a GSSG- és a tiol-tartalom. A GPx, a GR és a G6PD specifikus aktivitása nem változott (8. táblázat).

Az intracelluláris ROS-ok mennyiségének megemelkedésével párhuzamosan (7. táblázat), *t*-BuOOH-kezelt sejtekben, szignifikánsan megemelkedett a GSH-, GSSG- és tiol-tartalom mind a szülői, mind pedig a mutáns törzsből, jelezve a sejtek megváltozott oxidoredukciós állapotát. Ezt a változást követte a GSH homeosztázisért felelős enzimek aktivitásváltozása (GR, GPx, G6PD, és GST) (8. táblázat).

	Kontroll		<i>t</i> -BuOOH-kezelt	
	BY4741	<i>erg5Δ</i>	BY4741	<i>erg5Δ</i>
GSH ^a	42,21 ± 0,41	40,35 ± 2,19	59,83 ± 2,856***	88,6 ± 3,67 ⁺⁺⁺
GSSG ^a	0,618 ± 0,031	0,749 ± 0,0041 ^{###}	1,166 ± 0,079***	1,885 ± 0,12 ⁺⁺⁺
GSH/GSSG	66,3 ± 1,22	51,8 ± 5,7 ^{###}	49,31 ± 6,8***	45,0 ± 7,4
Tiolok ^b	8,71 ± 0,26	13,2 ± 4,5 ^{###}	32,6 ± 1,3***	33,9 ± 3,22 ⁺⁺⁺
Totál SOD ^c	20,76 ± 3,37	22,51 ± 2,52	25,54 ± 2,87	30,36 ± 2,05 ⁺⁺⁺
SOD _{CuZn} ^c	20,297 ± 3,38	21,73 ± 2,46	24,519 ± 2,82	29,544 ± 2,05 ⁺⁺⁺
SOD _{Mn} ^c	0,463 ± 0,02	0,784 ± 0,24 [#]	0,981 ± 0,21***	0,822 ± 0,19 ⁺
CAT ^d	0,593 ± 0,05	0,859 ± 0,12 ^{##}	0,933 ± 0,1***	0,769 ± 0,12
GPx ^e	2,436 ± 0,53	2,335 ± 0,086	2,495 ± 0,136	2,804 ± 0,29 ⁺⁺
GR ^e	34,47 ± 1,19	35,82 ± 4,3	43,01 ± 2,26***	50,37 ± 8,79 ⁺
G6PD ^e	85,7 ± 11,9	94,6 ± 11,5	110,6 ± 17,9*	109,6 ± 7,07 ⁺
GST ^e	3,72 ± 1,07	5,91 ± 1,1 [#]	6,76 ± 1,2**	7,28 ± 1,4

8. táblázat. GSH, GSSG és tiol tartalom, valamint specifikus SOD, CAT, GPx, GR, G6PD és GST koncentrációk 1 mM *t*-BuOOH-val, 1 órán keresztül kezelt *S. cerevisiae* szülői, valamint annak ergoszterin bioszintézisben sérült *erg5Δ* sejtjeiben. #, **⁺ *p* < 5%; ##, ***⁺⁺ *p* < 1%; ###, ***⁺⁺⁺ *p* < 0,1%, a Student *t*-teszt alapján számolva.

^a Tartalom nM (mg fehérje)⁻¹-ben megadva

^b Tartalom μM (mg száraztömeg)⁻¹-ben megadva

^c Specifikus aktivitás egység (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

^d Specifikus aktivitás μM (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

^e Specifikus aktivitás nM (perc mg fehérje)⁻¹-ben megadva

A szignifikáns különbségek magyarázatát lásd az 5. táblázatnál.

VII. Eredmények megvitatása

VII.1. A CTN pH-függő citotoxikus hatásának vizsgálata és a CTN felvétel-kinetikája

Haraguchi és mtsai. 1987-ben kimutatták a CTN toxin pH-függő citotoxikus hatását, mely szerint savasabb kémhatáson a toxin erősebb hatással rendelkezik, ezt azonban azóta gyakorlatilag egyetlen publikációban sem vették figyelembe. Ezt leellenőrizendő, mikrodilúciós módszer segítségével (NCCLS, 2002) vizsgáltuk a CTN *S. pombe*-ra kifejtett pH-függő citotoxikus hatását. pH = 4,5-en a CTN MIC értéke 175 μ M volt pH = 6,0-en pedig 1000 μ M (9. ábra). Eredményeink, összhangban Haraguchi és mtsai. (1987) megfigyelésével, nem-lineáris dózis- és pH-függést mutatnak. Szerencsére, a 4,5-es pH optimális a vizsgálatainkhoz használt *S. pombe* élesztő növekedéséhez is (Grimm és mtsai., 1988), amely tanszékünkön korábban már modellszervezetként szolgált egyéb mikotoxinok jellemzésénél, mint a PAT, a ZEA, vagy a CTN (Blaskó és mtsai., 2013; Mike és mtsai., 2013; Papp és mtsai., 2012). SM tápoldatban, pH 4,5-en a *S. pombe* generációs ideje 3,1 órával adódott.

A CTN citotoxikus hatását vizsgáló munkák nagy része sajnálatos módon vagy nem veszi figyelembe a pH-függő citotoxikus hatást, vagy pedig 6 és 8 közötti pH-n dolgozik (Chagas és mtsai., 1992a,b; Chan, 2007; Dönmez-Altuntas és mtsai., 2007; Golli-Bennour és Bacha, 2011; Iwahashi és mtsai., 1997; Johannessen és mtsai., 2007; Riberio és mtsai., 1997). A rendelkezésre álló publikációk másik csoportjában ezzel szemben vagy nem található semmilyen információ az alkalmazott pH-ról, vagy pedig az állatokon végzett krónikus teszt kísérletek miatt nem volt kontrollálható a kémhatás (Chen és Chan, 2009; Flajs és mtsai., 2010; Kumar és mtsai., 2011; Liu és mtsai., 2012; Qingping és mtsai., 2012). Mindazonáltal megemlítendő, hogy a külső savas pH nem képes számottevő változást okozni a belső pH-ban, mivel a sejtek szűk határok között szabályozzák a belső pH-homeosztázisukat. *S. pombe* exponenciálisan növekedő tenyészetében 4,5-es külső pH esetén a belső pH nem csökkent 6,0 alá (Valli és mtsai., 2005). A CTN pH-függő citotoxikus hatásának három dolog állhat a hátterében: (i) a megváltozott extracelluláris hidrogénion koncentráció által befolyásolt plazmamembrán funkciók (pl.: transzport, pH-függő fluiditás, stb.) (Carmelo és mtsai., 1997); (ii) nem optimális kémhatáson az általános stresszválasznak köszönhető fokozott toleranciája, adaptációja az élesztősejteknek, ugyanis az általános stresszválasz során indukálódik számos antioxidáns hatású molekulának a szintézise [pl.: a tioredoxinok (*Trx2*), a glutaredoxinok (*Gtr1*), a SOD_{CuZn} (*Sod1*), a citoszolikus CAT (*Ctt1*), valamint a glutation peroxidáz (*Gpx1*) (Causton és mtsai., 2001; Gasch, 2003)], ami segítségül szolgálhat a CTN-indukálta oxidatív

stresszhatással szemben; illetve (iii) a CTN molekula semleges, illetve savas pH-án történő disszociációja. A pH emelkedése a CTN gyűrűs szerkezetének (3. ábra) felnyílását okozza (Reinhard és Zimmerli, 1999), amit már egyéb poliketid típusú mikotoxinok (pl. PAT, ochratoxin A) esetében is kimutattak (Bazin és mtsai., 2013; Dombrink-Kurtzman és Blackburn, 2005). A haszonállatok gyomornedvének savas pH-ja tehát indokoltá teszi a CTN citotoxicitás pH-függésének szem előtt tartását a jövőbeli kísérletek során.

S. pombe közép-logaritmikus fázisú tenyészetének (10^7 db sejt ml^{-1}) SM tápoldatban, pH = 4,5-en történő, 60 perces, 1000 μM -os CTN kezelése 21%-os csökkenést okozott a szaporodóképes sejtek számában (11. ábra). Minden további kísérletünket e szigorúan szabályozott paraméterek mellett folytattuk, ezzel a 79%-os túlélési rátával azért, hogy a mikotoxin-indukálta oxidatív stressz direkt következményeit vizsgáljuk élő sejteken, és ne a hosszú távú hatásokat apoptotikus vagy nekrotikus sejteken.

A CTN MIC értéke mind pH = 4,5-en, mind pH = 6,0-on egészen magas volt, ezért feltételeztük, hogy a hasadó élesztő sejtfa adszorbeálja a toxint. A sejtfa egyes komponensei, mint az (1-3) β -D glükán, amely a sejtfa alkotó poliszaharidoknak 50-54%-át adja (Duran és Perez, 2004), felelős pl. a ZEA 80%-ának *in vitro* bioadszorpciójáért (Sabater-Vilar és mtsai., 2007). A pusztítási görbe felvételével megállapított, valamint a további kísérletekben alkalmazott 1000 μM CTN-nek csak 30%-át vették fel az intakt sejtek 20 perc alatt (13. ábra), ami megkérdőjelezi az élesztők sejtfaának bioadszorpcióját. A sejtfa enzimikus eltávolítása után azonban a CTN felvétele megduplázódott (58%) (13. ábra), ami arra enged következtetni, hogy a sejtfa gátolja a CTN felvételét. Az intakt sejteken és protoplasztokon kapott telítési görbe alapján a *S. pombe* sejteken nincs a CTN-felvétel sebességével egyenértékű aktív transzport vagy a toxin lebontását végző metabolizmus. Sarjadzó élesztő sejteken Haraguchi és mtsai. (1987) pH = 4,4-en magasabb (kb. 40%-os) felvételt tapasztalt.

VII.2. A CTN oxidatív stressz-indukáló hatása és következményeinek vizsgálata

CTN-nel szembeni adaptációs mechanizmust korábban semmilyen tesztrendszerben sem vizsgáltak. A sejtek CTN szubinhibitorikus koncentrációjával (1000 μM) (11. ábra) történő egy órás előkezelése alátámasztotta a *S. pombe* sejtek adaptációs képességét CTN jelenlétében (12. ábra). Hasonló stressz-adaptációt figyeltünk meg hasadó élesztő sejteken PAT-tal (Papp és mtsai., 2012) és ZEA-val (Mike és mtsai., 2013) szemben, amelyek ugyancsak oxidatív stresszt indukálnak. Az 5. ábrán láthatjuk, hogy az oxidatív stresszre érzékeny Pap1 és Atf1 transzkripciós faktorok meghatározó szerepet töltenek be a

mikotoxinok ártalmas hatásainak kivédésében és az adaptációs folyamatok szabályozásában. A Pap1 és Atf1 emlősökben fellelhető homológjai a c-Jun és az ATF2, amelyek a JNK és p38 stressz-aktivált protein-kinázok által szabályozottak (Tibbles és Woodget, 1999). Kumar és mtsai. (2011) szignifikáns növekedést tapasztaltak egér epidermális sejtek p53 és p21/waf1 aktivitásában 12-72 óras, 50 μg CTN egér⁻¹ kezelést követően. A p53 stressz-szignált továbbít a p21/waf1 ciklin-függő kináz inhibitorra, melynek up-regulációja felelős a sejtciklus blokkjáért, illetve a DNS-károsodás indukálta apoptotikus folyamatokért (Abbas és Dutta, 2009; Jiang és mtsai., 2010). Az oxidatív stressz indukálható Hsp90 overexpressziója szignifikáns csökkenést eredményezett a CTN-nel kezelt egér embrionális őssejtek apoptotikus sejtjeiben, amely adaptációs folyamatokat feltételez (Chan, 2007).

A szakirodalom alapján tudjuk, hogy a CTN hatására oxidatív stressz alakul ki, aminek következtében 2-3-szoros emelkedést figyeltek meg az össz ROS-koncentrációban egér bőrpreparátumban, illetve HepG2 sejteken (Chen és Chan, 2009; Kumar és mtsai., 2011; Wang és Joseph, 1999). Az emlős sejteken megfigyeltekkel egyetértésben az egy óras, 1000 μM -os CTN kezelés kétszeres növekedést indukált a *S. pombe* össz ROS-koncentrációjában (2. táblázat). Érdeemes megemlíteni, hogy az össz ROS-koncentrációban bekövetkezett növekedés az intracelluláris peroxidok koncentráció-növekedésének következménye, mivel az egy óras CTN kezelés nem okozott szignifikáns változást az intracelluláris $\text{O}_2^{\bullet-}$ tartalomban (2. táblázat). Ez egy rendkívül érdekes megfigyelés, mivel a CTN elsődleges támadáspontja a mitokondrium (Chagas és mtsai., 1992a,b; 1995; Riberio és mtsai., 1997), tehát az I-es mitokondriális rendszer gátlása $\text{O}_2^{\bullet-}$ akkumulációt kellene hogy indukáljon (Pelicano és mtsai., 2003). Mivel a SOD specifikus aktivitásban nem tapasztaltunk változást (3. táblázat), ezért úgy gondoljuk, hogy a $\text{O}_2^{\bullet-}$ eliminálása GSH-függő folyamatoknak köszönhető. A GSH magában, vagy a GPx kofaktoraként képes reagálni $\bullet\text{OH}$ -kel, H_2O_2 -dal és $\text{O}_2^{\bullet-}$ -kel. Jones és mtsai. (2003) mutatták be, hogy a GSH H_2O_2 termelés közben képes a $\text{O}_2^{\bullet-}$ eliminálására ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{GSH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{GS}^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}_2$). A mitokondriális eredetű $\text{O}_2^{\bullet-}$ -nak akár 22%-a alakítódhat át ebben a folyamatban. A CTN-nel kezelt sejtekben tapasztalt 3-szorososan megemelkedett intracelluláris GSH-tartalom elősegíthette ezt a folyamatot (3. táblázat, Jones és mtsai., 2003), továbbá az is lehetséges, hogy a sejtben jelenlévő SOD elegendőnek bizonyult az átalakításhoz, ami miatt nem tapasztaltunk változást az aktivitásában (3. táblázat). Ezt a hipotézist alátámasztja a peroxidok akkumulációja, a $\text{O}_2^{\bullet-}$ változatlan koncentrációja (2. táblázat) és a CTN-nel kezelt sejtekben lezajló lipid-peroxidáció (Kumar és mtsai., 2011). Továbbá 20 percre csökkentett kezelési idő esetén, gátat szabva az antioxidáns enzimek expressziójának, 91%-os növekedést tapasztaltunk a $\text{O}_2^{\bullet-}$

koncentrációjában (*1. melléklet*), amely O_2^{\bullet} az egy órás kezeléseink során a fent tárgyalt folyamatoknak köszönhetően H_2O_2 -dá alakult. A megemelkedett H_2O_2 koncentráció pedig megmagyarázza CAT specifikus aktivitásának növekedését, valamint a megnőtt GSH koncentráció alapján ez az antioxidáns molekula is fontos szerepet tölthet be semlegesítésben (*15. és 17. reakcióképletek*). Az intracelluláris $\bullet OH$ - és Cr(V)-koncentrációk EPR spektroszkópia segítségével kerültek meghatározásra (Pesti és mtsai., 2002). Az ebből származó adatok a sejtek Fenton- és Haber-Weiss-reakciókon keresztüli $\bullet OH$ -termelő kapacitását, és a Cr(VI) redukáló kapacitását tükrözik. A Cr(VI)-ot olyan kis molekulású antioxidánsok képesek redukálni [$Cr(VI) \rightarrow Cr(V)$], mint a cisztein, a GSH, a NADPH és más antioxidáns enzimek, mint a NADPH/GR rendszer, ahol a GR egy NADPH/flavoenzim (Poljask és mtsai., 2010). Amikor Cr(VI)-t adtunk a CTN-nel kezelt sejtekhez, akkor sem a $\bullet OH$ koncentrációjában, sem pedig a Cr(V) koncentrációjában nem tapasztaltunk változást (*2. táblázat*). A kezelt sejtek megemelkedett GSH-tartalma és a lecsökkent GR-specifikus aktivitása ellenére az össz tiol-tartalom csökkent, amely alapján ezek a fiziológiai változások finom egyensúlyban vannak egymással (*3. táblázat*).

A CTN okozta peroxid-akkumulációra válaszolva, a Pap1 és Atf1 transzkripció faktorok által szabályozva (*14. ábra*) több változást figyeltünk meg az antioxidáns enzimek aktivitásában. A H_2O_2 -t semlegesítő, a CAT enzim specifikus aktivitása lecsökkent és a GSH peroxidok általi oxidációját katalizáló GPx specifikus aktivitása pedig megnőtt. A két enzim ellentétes szabályozása feltehetően a peroxid és GSH túltermelés, valamint a GR specifikus aktivitás csökkenésének köszönhető (*3. táblázat*). A csökkent GR aktivitás lehetséges okai az enzim CTN által kiváltott részleges inaktivációja (Riberio és mtsai., 1997), illetve a magas GSH-tartalom miatti feed-back folyamat. Mindezekén túl, Kumar és mtsai. (2011) csökkent GPx-aktivitást tapasztalt 50 vagy 100 μM CTN-nel kezelt egér bőrsejt preparátumon, 12-72 akut toxicitási tesztben. Úgy tűnik, hogy a CTN kezelés hatására kialakuló GSH túltermelés (*3. táblázat*) a toxin direkt hatása, amely megfigyelést Iwahashi és mtsai. (2007) microarray mérései is alátámasztanak. A gyenge CTN-GSH molekuláris kölcsönhatás (Blaskó és mtsai., 2013) nem bizonyult elegendőnek, hogy adduktok kialakításán keresztül csökkentse az intracelluláris GSH-koncentrációt, szemben a PAT mikotoxinnál bizonyítottakkal (Blaskó és mtsai., 2013; Papp és mtsai., 2012; Pfeiffer és mtsai., 1998). Bár a GSH/GSSG aránya nem változott szignifikánsan a kontroll és CTN-nel kezelt minták között, a csökkent GR-aktivitásnak köszönhetően a GSSG koncentrációja megemelkedett (*3. táblázat*). Pócsi és mtsai. (2004) kimutatták, hogy a megemelkedett GSSG-koncentráció meghatározó szerepet tölt be az antioxidáns védelmi rendszer indukciójában, beleértve a GST aktivitásának

változását (3. táblázat). GST a xenobiotikumok detoxifikálásában kulcsfontosságú enzim, pl. a PAT-GSH addukt kialakításában tölt be meghatározó szerepet (Blaskó és mtsai., 2013; Iwahashi és mtsai., 2004; Papp és mtsai., 2012). Ezzel ellentétes eredményekről, csökkent GSH-koncentrációról számoltak be (i) humán alveoláris epitél sejtekből, kezelve 50 μg CTN-nel 6 órán keresztül (60%-os életképesség) (Johannessen és mtsai., 2007), és (ii) krónikus kezelésekből származó patkány veséből, illetve májból (20 mg kg^{-1} , 2 napig orálisan) (Flajs és mtsai., 2010). A kapott eredmények valószínűleg a hosszú kezelési időnek, illetve a sejtek alacsony életképességnek tudhatóak be a mérések időpontjában. Idő-függő (12-72 óra) és dózis-függő (25-100 μM CTN) csökkenést tapasztaltak a GSH-koncentrációban, akárcsak a CAT és GPx aktivitásában, egér bőrpreparátum egyszeri kezelését követően, amely 7,6-25-szörös növekedést indukált az apoptotikus sejtek számában (Kumar és mtsai., 2011). Elmondhatjuk, hogy magas 70-80%-os életképesség/túlélés mellett a GSH koncentrációnövekedés egyértelmű következménye a CTN kezelésnek. Alacsony életképesség mellett más, másodlagos következményeit láthatjuk az oxidatív stressznek, úgy mint apoptózis, nekrozis, hipokoleszterolaemia vagy nefropátia (Chan, 2007; Chan és Shiao, 2007; Chen és Chan, 2009; Liu és mtsai., 2012).

Mások megfigyeléseivel egyetértésben, az 1000 μM -os, 60 perces CTN kezelés G2/M fázisblokkot okozott, ami a G1/G2/M-fázisú sejtek, S-fázissal szembeni csökkenéséből látszik. Az irodalmi áttekintés III.3.2. fejezetében már említett, *S. pombe* sejtciklus-sajátosságok miatt a G1 sejtek két sejtmaggal rendelkeznek (áramlási citométeres analízis során két 1C DNS). Az analízis során megegyező csúcsot kapunk a 2C DNS-t egy sejtmagban tartalmazó G2 sejteknél, vagy az M sejteknél, amelyek két különálló, 1C DNS-sel rendelkeznek. Továbbá az összeragadt, de már újra osztódó S-fázisú sejtek 4C DNS-sel rendelkeznek (Gómez és Forsburg, 2004; Knutsen és mtsai., 2011). A sejtciklus-blokk hátterében részben a mitotikus húzófonalak ROS-ok általi zavarása áll (Chang és mtsai., 2011). A CTN képes a mikrotubulusok polimerizációjának *in vitro* gátlására, ezáltal G2/M fázisblokk vagy DNS-károsodások okozására. Ez a folyamat figyelhető meg az általunk tapasztalt sejtmag fragmentáción is (16. ábra), amely apoptózist indukálhat (Kumar és mtsai., 2011).

A CTN okozta oxidatív stresszfolyamatok jellemzéséhez H_2O_2 -t, mint jól jellemzett pozitív kontrollt alkalmaztunk (60 perces, 200 μM -os kezelés esetén 98% a szaporodóképes sejtek száma). Ez a kezelés a peroxidok akkumulációját (2. táblázat; Lin és mtsai., 2007) és a $\bullet\text{OH}$ koncentrációjának csökkenését okozta (2. táblázat). A lecsökkent SOD specifikus aktivitás (3. táblázat) alapján feltételeztük a $\text{O}_2^{\bullet-}$ koncentráció változását, azonban abban nem

tapasztaltunk eltérést. A lecsökkent $\bullet\text{OH}$ -koncentrációt a Cr(V) re-oxidációja okozta Cr(VI)-á, amellyel párhuzamosan a GSH és a tiolok koncentrációja is csökkent, vagy a sejtek redukáló ereje csökkent, ezért keletkezett kevesebb Cr(V) és vele párhuzamosan kevesebb $\bullet\text{OH}$ (3. táblázat). A szakirodalomban Lee és mtsai. (1995), Toone és mtsai. (1998), Gasch és mtsai. (2003), Herrero és mtsai. (2008) és Pekmez és mtsai. (2008) által közölt adatok majdnem teljes azonosságot mutatnak eredményeinkkel. 200 μM H_2O_2 hatására csökkent a GSH és a tiolok koncentrációja, megemelkedett a CAT-, a G6PD-, GST-, a GSH-fogyasztó tioredoxin-reduktáz és a tioredoxin aktivitása (Chen és mtsai., 2008); csökkent a SOD és GR specifikus aktivitása, a GPx-é pedig nem változott (Lee és mtsai., 1995; Nguyen és mtsai., 2007; Pekmez és mtsai., 2008). Összehasonlítva a CTN és a H_2O_2 által okozott oxidatív stresszfolyamatokat (2. és 3. táblázatok) elmondhatjuk, hogy a két vegyület mintázatbeli különbségének oka az eltérő hatásmechanizmus, ugyanis a H_2O_2 egy külsőleg alkalmazott peroxid forrás, a CTN pedig a mitokondriumon keresztül indukál peroxid-akkumulációt. Ezzel párhuzamosan, a CTN erősen befolyásolja a plazmamembrán-mitokondriális membrán-funkciókat is (Blaskó és mtsai., 2013; Riberio és mtsai., 1997) a szterin-bioszintézis gátlásán keresztül (Endo és Kuroda, 1976). Elmondhatjuk továbbá, hogy a CTN közepes mértékű oxidatív stresszt indukál, mivel a *S. pombe atf1 Δ* mutánsban a funkcionális Pap1 faktor nem volt képes teljes mértékben regulálni a stresszhatást, míg a *pap1 Δ* mutánsban a CTN által generált oxidatív stressz elérte az Atf1 útvonal aktiválásához szükséges, kb. 1 mM H_2O_2 -dal egyenértékű hatást, de úgy tűnik, hogy nem bizonyult elég erősnek, a *pap1 Δ* mutáns csökkent életképessége alapján (14. ábra, Vivancos és mtsai., 2006).

A CTN hatásmechanizmusának összefoglalása akut toxicitási tesztekben kb. 70-80%-os élő sejt számnál: (i) az intakt élesztő sejtek a CTN-nek csak 30%-át veszik fel a sejtfal barrier funkciójá miatt (13. ábra); (ii) a plazmamembrán dózis-függő fluidizációja miatt esszenciális K^+ -ion kiáramlást okoz (Blaskó és mtsai., 2013); (iii) a CTN 46,1%-a a sarjadzó élesztő sejtek mitokondriumában akkumulálódott, ami a légzési lánc diszfunkcióját okozta (Chagas és mtsai., 1992a,b; Riberio és mtsai., 1997); (iv) a CTN aktiválja a GSH bioszintézisét (Iwahashi és mtsai., 2007), ami a GSH akkumulációját okozza (3. táblázat); (v) a CTN össz ROS-akkumulációt (2. táblázat; Chen és Chan, 2009; Kumar és mtsai., 2011), valamint a peroxidok akkumulációját okozza (2. táblázat); (vi) ami aktiválja az oxidatív stressz-érzékeny Pap1 és részben az Atf1 transzkripció faktor (14. ábra), valamint állati sejtek esetén a c-Jun-t és a Prr1p-t (Chen és Chan, 2009; Quinn és mtsai., 2002); (vii) a peroxidok megnövekedett koncentrációjának hatására sejtciklus blokkja következik be mind élesztő, mind pedig humán sejteken (15. ábra; Chang és mtsai., 2011); (viii) az aktivált

transzkripciós faktorok hatására up- és down-regulálódik néhány fontos antioxidáns enzim (3. táblázat; Johannessen és mtsai., 2007; Kumar és mtsai., 2011); (ix) a ROS-ok, azaz a peroxidok hatására indukálódik a hősokk fehérje Hsp70 (Golli-Bennour és Bacha, 2011), fragmentálódnak a sejtmagok (16. ábra), mikronukleuszok jelennek meg (Dönmez-Altuntas és mtsai., 2007) és apoptózis következik be (Chan, 2007).

A CTN hatásmechanizmusának összefoglalása krónikus toxicitási tesztekben: (i) a CTN gátolja a koleszterin bioszintézisének kulcsenzimeit, ami csökkenti szérumszteron koncentrációját és hipokoleszterolémiát eredményez (Endo és Kuroda, 1976); (ii) a hormonrendszer zavarásán keresztül többféle immunmódosító hatással rendelkezik (Qingping és mtsai., 2012); (iii) különféle állati modellrendszereken bizonyították nefro-, hepato- és főtotoxikus hatásait (Carlton és mtsai., 1974; Xu és mtsai., 2006).

VII.3. Az *ERG5* gén mutációjának hatása a plazmamembránnal összefüggő folyamatokra

S. cerevisiae szülői BY4741-es törzséhez viszonyítva, az ergoszterin-bioszintézisben sérült mutáns törzsek (*erg2Δ*, *4Δ*, *5Δ*, és *6Δ*) szignifikánsan megnövekedett toleranciát mutattak amfotericin B-vel szemben (4. táblázat), mivel az ergoszterin hiányzott a sejtek plazmamembránjából. A plazmamembránban fellelhető szterinek közül, az amfotericin B az ergoszterinnel képezi a legerősebb komplexet, melynek létrejötte a plazmamembrán dezorganizációjához vezet (Ghannoum és Rice, 1999; Pesti és mtsai., 1982; Odds, 1988). Az *erg5Δ* mutáns plazmamembránjában bekövetkezett változásokat fluoreszcens anizotrópia mérésekkel vizsgáltuk. A mutánsban tapasztalt, szignifikánsan magasabb *r*-érték alapján (19. ábra), az alkalmazott TMA-DPH fluorofór mobilitása lecsökkent a membránban, ami megnövekedett rigiditásról ad információt (Kazuhiro és mtsai., 1998). Az *erg5Δ* mutáns plazmamembrán-rigiditásának megnövekedése hátterében a következő folyamatok állhatnak: (i) az *erg5Δ* sejtekben tapasztalt, 49,8%-kal magasabb totál szterin-tartalom (5. táblázat); (ii) valamint a mutáns sejtekben a PLFAs telített zsírsava mennyiségének megnövekedése és a telítetlen/telített zsírsavak arányának lecsökkenése (6.B és 6.E táblázat), illetve a TFAs és TAGFAs telített zsírsavak mennyiségének lecsökkenése (6.E táblázat). Eredményeinkhez hasonlóan, az ergoszterin elvesztésének túlkompenzálását figyelték meg ergoszterin-mutáns *C. albicans erg-2* sejteken, ahol a rendparaméter megemelkedése ugyancsak a rigiditás növekedését bizonyította, aminek a hátterében megváltozott szterin- és zsírsav-összetétel áll (Pesti és mtsai., 1985, 2000). Hasonló jelenséget figyeltek meg egy *t*-BuOOH-toleráns *S. pombe hyd1-190* mutáns törzs esetében is (Kálmán és mtsai., 2013). Lees és mtsai. (1984)

kimutatták, hogy az alacsony koleszterin/ergoszterin-szint szignifikánsan befolyásolja a lipid- és fehérjeszintézist, valamint a zsírsav-felvételt. A plazmamembránban bekövetkezett funkcionális változásokat, a passzív diffúzióval felvételre kerülő glicerinnel hasznosításával vizsgáltuk (Gancedo és mtsai., 1968; Pesti és Novák, 1984). A plazmamembrán összetételének megváltozása (5. táblázat, 6. A és 6. D táblázat) maga után vonta a sejtek csökkent glicerinnel-felvételét (20. ábra). A fentebb említett *S. pombe hyd1-190* és *C. albicans erg-2* törzsek mindegyikénél csökkent glicerinnel-felvételt figyeltek meg a szülői törzshöz képest (Kálmán és mtsai., 2013; Pesti és mtsai., 1985, 2000). *In vitro* kísérletekben igazolást nyert, hogy a glicerinnel liposzómákba történő bejutása lecsökkent, amikor a membránlipidek rendezettebb gél állapotba kerültek (Demel és mtsai., 1972).

VII.4. Az *erg5Δ* mutáns redox-homeosztázisának vizsgálata

S. cerevisiae ergoszterin-bioszintézisben sérült mutánsainak érzékenységét vizsgáltuk oxidatív stresszorokra, mint *t*-BuOOH-ra, H₂O₂-ra, menadionra, Cd²⁺-ra és Cr(VI)-ra (4. táblázat). A szülői BY4741-es törzshöz viszonyítva, az *erg5Δ* mutáns 2,5-szer nagyobb érzékenységet mutatott *t*-BuOOH-val szemben (4. táblázat, 17. ábra), valamint egy megváltozott oxido-redukciós állapotot (7. és 8. táblázat). A kezeletlen mutáns sejtekben szignifikánsan lecsökkent a O₂[•] és a H₂O₂ koncentrációja, amelynek háttérében feltehetően a SOD_{Mn} és a CAT enzimek megnövekedett specifikus aktivitása áll (8. táblázat; Halliwell és Gutteridge, 1999). Az *erg5Δ* sejtekben nem változott sem a GSH koncentrációja, sem pedig a GR specifikus aktivitása, azonban a tiolok koncentrációja megnőtt, mely utóbbi magyarázatként szolgálhat a Cr(VI) Cr(V)-té történő, megnövekedett redukciójára és a megemelkedett •OH-koncentrációra (7. és 8. táblázat). Feltehetőleg, a megemelkedett GSSG-koncentrációnak köszönhető a megnövekedett GST specifikus aktivitás. A megváltozott oxido-redukciós állapot alapján, szakirodalmi adatokkal egyetértésben, néhány egy génes mutáció belső stresszhatásként szolgálhat (Halliwell és Gutteridge, 1999; Kálmán és mtsai., 2013; Pesti és mtsai., 2002). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az *erg5Δ* mutáns egy alacsony szintű, állandó, de tolerálható stresszhatás alatt áll, ami néhány antioxidáns enzim (SOD_{Mn}, CAT, és GST) folytonos regulációját eredményezi. A mutáns sejtek *t*-BuOOH-val szembeni 2,5-szeres érzékenysége valószínűsíthetően a mutáció okozta, megnövekedett telítetlen zsírsavtartalom eredménye (6. táblázat). Az *erg5Δ* sejtek 1,75-szeres CdCl₂ toleranciája (a CdCl₂ egy GSH-fogyasztó xenobiotikum, amely a O₂[•] és a H₂O₂ akkumulációját okozza) a megnövekedett SOD_{Mn}- (O₂[•] → H₂O₂ átalakításért felelős) és CAT- (H₂O₂ semlegesítés)

aktivitással magyarázható (7 és 8. táblázat) (Gille és Sigler, 1995; Halliwell és Gutteridge, 1999; Jamieson, 1998).

Sajnálatos módon a mutációkról, mint (oxidatív) stresszt indukáló faktorokról nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat, hacsak az a mutáció nem pl. valamelyik antioxidáns molekula kódolásáért felelős gént (*gshΔ*, *sodΔ*, stb.) érinti. Ennek oka, hogy a legtöbb esetben az oxidatív stressz DNS-károsító hatásának tudják be a mutációkat, nem pedig fordítva, így eredményeink merőben újak.

VII.5. A *t*-BuOOH kezelés plazmamembrán összetételére és a sejtek redox-állapotára gyakorolt hatásának vizsgálata

Annak érdekében, hogy az 1 mM *t*-BuOOH kezelés plazmamembrán-összetételre gyakorolt hatásait vizsgálni tudjuk, 5 órás, legalább egy generáción keresztül fennálló kezelést alkalmaztunk. A kezelés mindkét törzsben adaptációs folyamatokat indukált szterin- és zsírsav-összetétel szinten annak érdekében, hogy a sejtek kompenzálják a *t*-BuOOH MUFA-n és PUFA-n kifejtett lipid-peroxidációs hatását (5. és 6.A-6.E táblázatok) (Krasowska és mtsai., 2003; Kunimoto és mtsai., 1981). Hasonló adaptációs mechanizmust mutattak ki H₂O₂-dal kezelt *S. cerevisiae* sejtek membránlipid-összetételében (Pedrosa és mtsai., 2009). A *t*-BuOOH plazmamembránra kifejtett fluidizáló/rigidizáló hatását fluoreszcens anizotrópia mérésekkel vizsgáltuk. Mindkét alkalmazott törzs esetében fluidizáló hatást figyeltünk meg, amely a szülői törzsben 24%-kal kisebb mértékű volt (19. ábra). Úgy gondoljuk, hogy ennek hátterében a kezelés hatására bekövetkező, mindkét törzs esetében lecsökkent totál szterintartalom áll (5. táblázat). Kezelés hatására, az *erg5Δ* mutánsban a PLFAs és FFAs telítetlen zsírsavainak aránya szignifikánsan megemelkedik (6. E táblázat), ami hozzájárulhat a törzs 2,5-szeres *t*-BuOOH-érzékenységéhez (4. táblázat, 17. ábra). Megemlítendő, hogy a szterin- és zsírsav-analízisből származó eredmények nem vethetőek össze direkt módon az anizotrópia mérésekből származó eredményekkel az eltérő kezelési idő miatt. Analóg eredményre jutottak Thanh és mtsai. (2007), linolsav-hidroperoxiddal kezelt *Yarrowia lipotica* élesztő sejtek membrán-fluiditása megnövekedett, amely alapján a lipid-peroxidáció és a membrán-fluiditás növekedése szoros kapcsolatban áll. Thanh és mtsai. (2007) megfigyelésével szemben, az ismert membrán-összetételű *S. pombe hyd1-190* mutáns törzsén fluidizáló hatást fejtett ki a *t*-BuOOH kezelés, a *hyd*⁺ szülői törzsön pedig rigidizáló hatást (Kálmán és mtsai., 2013).

A *t*-BuOOH indukálta oxidatív stresszfolyamatok tanulmányozásához, a közép-logaritmikus fázisú tenyészeteket 1 mM *t*-BuOOH-val kezeltük egy órán keresztül. A BY4741-es szülői törzsben a O₂^{•-} koncentrációja 6,7-szeresére emelkedett a kezelés után, a

mutánsban pedig 2,3-szeresére; a peroxidok mennyisége 6,8-szeresre a szülői sejtekben és 3,2-szeresre az *erg5Δ* mutánsban (7. táblázat). A megnövekedett $O_2^{\bullet-}$ -öt H_2O_2 -dá alakító mitokondriális SOD_{Mn} specifikus aktivitása megemelkedett a szülői törzsben, a citoplazmás SOD_{CuZn} specifikus aktivitása pedig az *erg5Δ* mutánsban (8. táblázat). A megemelkedett peroxid-koncentrációra a két törzs különbözően reagált. A szülői törzsben H_2O_2 -t semlegesítő CAT enzim specifikus aktivitása emelkedett meg, a *t*-BuOOH-ra 2,5-szeres érzékenységet mutató *erg5Δ* mutánsban pedig feltehetően a GSH-GPx-GR útvonalon keresztül szabályozódott a *t*-BuOOH által kiváltott stresszhatás (8. táblázat). Létezik a GST-nek olyan típusa, a szelén-független glutation-peroxidáz, amely rendelkezik GPx-aktivitással (Halliwell és Gutteridge, 2007) és a szerves peroxidok (lipidperoxidok) semlegesítésében vesz részt. A BY4741-es *t*-BuOOH kezelt törzsben szignifikánsan megemelkedett a GST-aktivitás (8. táblázat). A sejtek intracelluláris redukáló kapacitásáról információt adó $\bullet OH$ és Cr(V) is ellentétesen változott a két kezelt törzsben. A BY4741-es törzsben növekedett mindkét vizsgált paraméter, az *erg5Δ* mutánsban pedig csökkent (7. táblázat). Ez úgy magyarázható, hogy a mutáns törzsben a Fenton-reakció során a Cr(V) visszaoxidálódik Cr(VI)-tá, a folyamat pedig $\bullet OH$ -t termel [csökkent Cr(V) mennyiség, 7. táblázat]. A keletkezett $\bullet OH$ pedig reagálva a H_2O_2 -dal $O_2^{\bullet-}$ -ké alakul a Haber-Weiss-reakció során. Mivel a mutáns törzsben a kezelés hatására kisebb mértékben akkumulálódtak a vizsgált ROS-ok, és az antioxidáns enzimek specifikus aktivitása is kevésbé nőtt meg (7. és 8. táblázatok), ezért a törzs megnövekedett *t*-BuOOH-érzékenységének hátterében (4. táblázat, 17. ábra) a kezelés membrán-dezorganizáló és membrán-összetételt megváltoztató hatása állhat (6. táblázat, 19 és 20 ábrák). A különböző élesztő és gomba fajok, mint a *S. cerevisiae* (jelen tanulmány; Inoue és mtsai., 1993), a *C. albicans* (Fekete és mtsai., 2007, 2008), a *Hansenula mrakii* (Tran és mtsai., 1995), a *S. pombe* (Kálmán és mtsai., 2013) és a *Penicillium chrysogenum* (Emri és mtsai., 1997) lipid-peroxidációt indukáló ágensekkel történő kezelése eltérő antioxidáns mintázatot eredményezett, ami jól demonstrálja az oxido-redukciós homeosztázis szabályozásának komplexitását és törzs-függését.

Kapott eredményeink jól tükrözik egy egygénes deléció következményeit a *S. cerevisiae erg5Δ* mutáns törzsben, amely számos fiziológiás folyamat megváltozását okozta a szülői BY4741-es törzshöz viszonyítva, indukált oxidatív stressz hiányában is. A plazmamembrán szterin-összetételének megváltozása amfotericin B-vel szembeni rezisztenciát indukált, megnövekedett a telítetlen zsírsavak aránya és a plazmamembrán rigiditása, valamint csökkent a glicerín felvétele. Kontroll körülmények között az *erg5Δ* mutáns 2,5-szeres érzékenységet mutatott *t*-BuOOH-ra, amelyhez társult egy megváltozott

oxido-redukciós állapot (csökkent $O_2^{\bullet-}$ és H_2O_2 és megnőtt $\bullet OH$), és up-regulálódott az antioxidáns enzimek egy része (SOD_{Mn} , CAT és GST). Hosszú távú (5 órás) akut kezelések során a *t*-BuOOH-kezelés adaptációs folyamatokat indukált, aminek hatására megváltozott a plazmamembrán szterin- és zsírsav-összetétele; egy órás, szubinhibitorikus kezelés során megnőtt a membrán fluiditása és az intracelluláris ROS-ok koncentrációja, akárcsak a legfőbb antioxidáns enzimek aktivitása.

VIII. Összefoglalás

Kísérleteink során a haploid eukarióta *S. pombe* hasadó élesztő sejteken vizsgáltuk a CTN mikotoxin dózis-, idő- és pH-függő citotoxikus hatásait, oxidatív stressz-indukáló hatását, valamint a kialakult stressz sejt és molekuláris szintű szabályozását akut kezelést követően.

1.1. Alátámasztottuk és a további kísérletek során figyelembe vettük, hogy a CTN citotoxicitása pH-függő. pH = 6,0 esetén a CTN MIC₉₀ értéke 1000 μM volt, pH = 4,5-en pedig a MIC₉₀ érték 175 μM, mely utóbbi pH optimális a *S. pombe* mint modellszervezet számára is.

1.2. Kimutattuk, hogy a CTN citotoxikus hatása dózis- és idő-függő. Először alkalmaztunk olyan kísérleti rendszert, amelyben megállapítottuk a toxin további kezelésekhöz szükséges szubinhibitorikus koncentrációját (1000 μM), ahol a vizsgált sejtek legalább 70%-ka életképes/szaporodóképes.

1.3. Jellemeztük a CTN felvétel-kinetikáját. Kimutattuk, hogy a sejtfa barrier funkciójának köszönhetően a sejtfa vegetatív sejtek az alkalmazott 1000 μM CTN-nek mintegy 30%-át veszik fel, továbbá a kapott telítési görbe alapján valószínűsíthető, hogy a vizsgálatunk ideje alatt a toxin nem metabolizálódik és exportálódik.

1.4. Bizonyítottuk a CTN oxidatív stressz-indukáló hatását. Először mutattuk ki, hogy a 2-szeresre emelkedett össz ROS-koncentráció háttérében a peroxidok koncentrációjának 1,5-szeres emelkedése áll. A CTN által előidézett oxidatív stressz erősségének meghatározásához a H₂O₂-t, mint jól jellemzett pozitív kontrollt használtuk, amely alátámasztotta valamennyi kísérleti eredményünk helyességét.

1.5. Első alkalommal bizonyítottuk a toxinnal szembeni sejtszintű adaptációs mechanizmus kialakulását. A szubinhibitorikus koncentrációval történő egy órás előkezelést követő újbóli pusztítási görbe felvétele után növekedést tapasztaltunk a sejtek túlélésében. 2000 μM-os CTN kezelés esetén a túlélés 2%-ról 50%-ra emelkedett, 1000 μM-nál pedig 79%-ról 98%-ra. Megállapítottuk, hogy az adaptációs folyamat háttérében elsősorban a redox-szenzitív Pap1 transzkripciós faktor áll, mivel a CTN-indukálta oxidatív stressz erőssége nem éri el teljes mértékben az Atf1-es faktor aktiválásához szükséges szintet, bár az *pap1Δ* törzs 35%-os túlélés alapján ez a transzkripciós faktor is részt vesz a szabályozásban.

1.6. A megemelkedett peroxid-koncentrációra reagálva, a Pap1 és Atf1 transzkripciós faktorokon keresztül, oxidatív stresszor-specifikusan szabályozódik az antioxidáns védelmi rendszer. Először mutattunk rá, hogy az oxidatív stresszfolyamatokat legalább 70%-os élő

sejtszám mellett kell vizsgálni, és hogy a GSH koncentrációjának növekedése ilyen sejtszám mellett egyértelmű, szemben azokkal, akik csökkenést mutattak ki. A GSH mennyiségi változását követte a GSH-homesztázisért felelős enzimek (GPx, GR, G6PD, GST) aktivitásának növekedése. H₂O₂ tekintetében a szakirodalommal megegyező antioxidáns választ kaptunk.

1.7. Az akkumulálódó ROS-ok hatására károsodott a sejtek örökítőanyaga, amely a sejtmagok fragmentációjában nyilvánult meg. A sejtmagok fragmentációja általánosan elfogadott apoptotikus marker. Az oxidatív károsodások javítása végett, illetve a mikrotubuláris rendszer ROS általi zavarása miatt a sejtek G2/M fázisában a sejtciklus blokkját figyeltük meg.

Munkánk második részeként *S. cerevisiae* sarjadzó élesztő *erg5Δ* mutánsán, illetve annak szülői törzsén vizsgáltuk az *ERG5* gén deléciójának következményeit a plazmamembrán összetételére és funkciójára, illetve a sejtek oxido-redukciós állapotára nézve. Továbbá *t*-BuOOH-val, egy lipid-hidroperoxid analóggal történő kezelést követően vizsgáltuk az előbb említett paramétereket.

2.1. Korábbi eredményekkel megegyezően kimutattuk, hogy ergoszterin-kiesés hatására az *erg5Δ* mutáns toleránsabbá vált az ergoszterinnel komplexet képező amfotericin B antimikotikummal szemben. Bár a bioszintézis végterméke, az ergoszterin kiesett, azt tapasztaltuk, hogy a sejtek össz szterin-tartalma mégis megemelkedett 49%-kal. A szterin túlkompensáció következtében, a plazmamembrán rigidebbé vált, amit a fluoreszcens anizotrópia *r*-érték növekedésén keresztül igazoltunk.

2.2. Elsőként figyeltük meg, hogy az *erg5Δ* mutáns 2,5-ször érzékenyebb a lipid-peroxidációt okozó *t*-BuOOH-ra, aminek hátterében a lipid-peroxidáció elsődleges célpontját képező telítetlen zsírsavak arányának a megemelkedése áll. Először mutattunk rá kísérleti eredményeinkkel, hogy az ergoszterin-homeosztázis megváltozása a vizsgált deléciós mutánsban megváltoztatja a redox-homeosztázist és így a mutáns érzékenységét számos oxidatív stresszorral szemben.

2.3. Az intracelluláris O₂^{•-}- és peroxid-koncentrációk meghatározásán keresztül először bizonyítottuk azt, hogy az *ERG5* gén mutációja egy megváltozott redox-állapotot okoz a sejtben. A kezeletlen *erg5Δ* mutánsban mindkét vizsgált paraméter szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kezeletlen BY4741 szülői törzsben. Ennek oka a szignifikánsan megemelkedett SOD_{Mn} és CAT specifikus aktivitása. A szignifikánsan magasabb GSSG-

koncentráció és GST specifikus aktivitása a törzs redox-homeosztázis megváltozásának egyértelmű jelei. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy az *erg5Δ* mutáns egy folyamatos, kismértékű, de tolerálható stresszhatás alatt áll, ami az előbb említett enzimek folyamatos expresszióját eredményezi.

2.4. A szakirodalom adatait alátámasztva kimutattuk, hogy a *t*-BuOOH kezelés mindkét vizsgált törzs esetében a plazmamembrán fluiditásának növekedését okozta, amely az össz szterin-tartalom *t*-BuOOH-indukálta csökkenésének következménye.

2.5. A plazmamembrán szerkezeti ártrendeződésén túl először mutattuk ki, hogy *t*-BuOOH-kezelés hatására, a szülői törzsben több mint 6-szorosra emelkedett a $O_2^{\bullet-}$ - és peroxid-tartalom, az *erg5Δ* mutánsban előbbi 2,4-szeresre, utóbbi pedig 3,2-szeresre. Erre reagálva az antioxidáns rendszer különbözőféleképpen szabályozódott a két törzsben. A BY4741-es szülőiben a GSH-koncentráció megnőtt, amit követett a GSH-homesztázisért felelős enzimek specifikus aktivitásának a megemelkedése, illetve megnőtt a CAT és SOD_{Mn} specifikus aktivitása. Ezzel szemben, az *erg5Δ* mutánsban mintegy 50%-kal nagyobb GSH-növekedést indukált a kezelés, mint a szülői törzsben, a CAT-aktivitás nem változott, és a SOD_{Mn} helyett a SOD_{CuZn} specifikus aktivitása nőtt meg.

IX. Summary

The haploid eukaryotic fission yeast *S. pombe* was used to investigate the dose-, time- and pH-dependent cytotoxic effects and oxidative stress-generating effects of the mycotoxin CTN, and the regulation of the stress processes evolved at cellular and molecular levels in acute toxicity tests.

1.1. The pH-dependent cytotoxic effect of CTN was confirmed and taken into consideration in the further experiments. The MIC₉₀ of CTN was 1000 µM at pH 6.0 and 175 µM at pH 4.5; the latter is optimal for the growth of the applied model organism.

1.2. Dose- and time-dependent cytotoxic effects of CTN were observed and the subinhibitory concentration of the toxin (1000 µM) was determined at which at least 70% of the cells were viable.

1.3. The kinetics of the uptake was characterized. Due to the barrier function of the cell wall, only 30% of the CTN was taken up by the vegetative cells from 1000 µM CTN solution. Moreover, the saturation curve of CTN uptake may point to the lack of active transport and metabolism during the interval involved in our investigations.

1.4. As a consequence of CTN-induced oxidative stress, a 2-fold increase in total ROS level was measured, solely as a consequence of the 1.5-fold increase in peroxide concentration. To compare the levels of induced oxidative stress, H₂O₂, a well-characterized positive control, was applied, which testified to the reliability of our results.

1.5. This was the first documentation of the adaptation capability of CTN-treated cells. Pretreatment of the cells with a subinhibitory concentration of CTN for 60 min caused significantly increased survival rates when these cells were treated with 1000 or 2000 µM CTN for a further 60 min: the colony-forming ability increased from 79% to 98% and from 2% to 50% in the cases of 1000 and 2000 µM CTN-treated cells. The adaptation process was proved to activate primarily the redox-sensitive transcription factor Pap1, since the impact of CTN-induced oxidative stress was not sufficient to activate the Atf1 pathway. This was manifested in a decreased growth yield of *pap1Δ*, though the factor Atf1 is also necessary for the regulation on the basis of the observed 35% growth yield.

1.6. Via the oxidative stress stimulus-induced transcription factor Pap1 and the MAPK-mediated Atf1, in response to the increment in peroxide concentrations, oxidative stressor-specific regulation of the antioxidant system was detected. We demonstrated that with at least 70% cell viability the elevated GSH concentration is unambiguous; in contrast with others, the results we obtained on the cultures revealed low cell viability. The increased

GSH concentration up- or down-regulated some of the antioxidant enzymes responsible for GSH homeostasis (GPx, GR, G6PD and GST). The results of H₂O₂ treatments were in good agreement with literature findings.

1.7. The accumulation of ROS-induced oxidative DNA damages was manifested in an increased number of fragmented nuclei. The cells strived to correct the oxidative damage and the ROS-mediated microtubule disorders by arrest of the cell cycle in the G2/M phase.

In the second part of our work, the haploid budding yeast *S. cerevisiae*, the *erg5Δ* deletion mutant and its parental strain BY4741 were applied to investigate the consequences of the absence of ergosterol (deletion in the *ERG5* gene) on the lipid composition and on the biophysical and biological functions of the plasma membrane. We also determined the oxidoreduction states of the strains and investigated the consequences of *t*-BuOOH treatment on the above-mentioned parameters.

2.1. In comparison with the parental strain BY4741, the *erg5Δ* mutant exhibited a significantly higher tolerance to amphotericin B, which forms a complex with ergosterol. Although, the end-product of ergosterol biosynthesis was not produced, the total sterol content of the cells was 49% higher. As a consequence of sterol overproduction, the rigidity (*r* value) of the plasma membrane of *erg5Δ* was elevated in comparison with the parental strain.

2.2. This is the first report that *erg5Δ* cells are 2.5-fold more sensitive to *t*-BuOOH than the parental strain. The explanation of this phenomenon is that the amount of unsaturated fatty acids (primary targets of lipid peroxidation) is higher. Our data also point to the altered sensitivity of the mutants of ergosterol biosynthesis to oxidative stressors.

2.3. The *erg5Δ* mutant possesses an unbalanced redox state, as confirmed by the determination of intracellular O₂^{•-} and peroxide contents. Both ROS were significantly lower in untreated *erg5Δ*, which may be a consequence of the significantly elevated specific activities of SOD_{Mn} and CAT. The higher concentration of GSSG induced an elevated specific activity of GST in *erg5Δ*, indicating the unbalanced redox state of the strain. *erg5Δ* cells are therefore under continuous, low-level, but tolerable stress, resulting in the continuous up-regulation of antioxidant enzymes.

2.4. In agreement with the literature, *t*-BuOOH-induced fluidization of plasma membrane was observed in the BY4741 strain and the *erg5Δ* mutant. This can be explained by the decreased total sterol content of *t*-BuOOH-treated cells.

2.5. Besides the realignment of the plasma membrane, this is the first description of a more than 6-fold increment in the concentrations of O₂^{•-} and peroxides in the parental strain,

and a 2.4-fold increase in the former and a 3.2-fold increase in the latter in the case of *erg5* Δ , after *t*-BuOOH treatment, resulting in different antioxidant responses. In BY4741, elevated GSH concentration and enzyme activities responsible for GSH homeostasis were detected, and the specific activities of CAT and SOD_{Mn} were also increased. In contrast with this, the *erg5* Δ deletion mutant exhibited a 50% higher GSH increment than that of the parental strain, whereas the specific activity of CAT did not change and, instead of SOD_{Mn}, the specific activity of SOD_{CuZn} was increased.

X. Melléklet

Minta	O ₂ ^{•-} ^a
Kontroll	8,17±1,21
1000 μM CTN	15,65±3,08**

l. melléklet. Intracelluláris O₂^{•-} tartalom 20 perces, 1000 μM-os CTN kezelés hatására, *S. pombe* sejtekben. ** $p < 1\%$, a Student *t*-teszt alapján számolva.

^a Fluoreszcencia intenzitás (mg száraztömeg)⁻¹-ben megadva.

XI. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Pesti Miklós professzor úrnak, hogy bizalmával lehetőséget nyújtott a doktori programban való részvételre, és hogy bölcs szakmai tanácsaival segítette előre munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Gazdag Zoltánnak, hogy munkámat mindvégig támogatta, és köszönöm értékes elméleti és gyakorlati útmutatásait.

Köszönet illeti Dr. Papp Gábort, aki bevezetett a mikotoxinok világába, és tanácsaival, gyakorlati ismereteivel nagyban hozzájárult munkámhoz.

Szeretném kifejezni köszönetemet volt PhD hallgató társamnak, Dr. Mike Nórának a sok hasznos tanácsot, ötletadó beszélgetést és a közös munkát.

Hálával tartozom Milan Čertik professzor úrnak a zsírsavanalízisben nyújtott segítségéért.

Köszönöm a PTE TTK BI Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék minden közreműködő munkatársának a segítséget.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családtagjaimnak, hogy mindvégig támogattak és türelemmel voltak irántam.

XII. Irodalomjegyzék

- Abbas, T., Dutta, A., 2009. P21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer.* 9, 400-414.
- Aherne, S.A., O'Brien, N.M., 2000. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radical Bio. Med.* 29, 507-514.
- Alic, N., Felder, T., Temple, M.D., Gloeckner, C., Higgins, V.J., Briza, P., Dawes, I.W., 2004. Genome-wide transcriptional responses to a lipid hydroperoxide: adaptation occurs without induction of oxidant defenses. *Free Radical Bio. Med.* 37, 23-35.
- Ammar, H., Michaelis, G., Lisowsky, T., 2000. A screen of yeast respiratory mutants for sensitivity against the mycotoxin citrinin identifies the vacuolar ATPase as an essential factor for the toxicity mechanism. *Curr. Genet.* 37, 277-284.
- Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulphide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113, 548-555.
- Armstrong, R.N., 1994. Glutathione S-transferases: structure and mechanism of an archetypical detoxication enzyme. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 69, 1-44.
- Arthington-Skaggs, B.A., Jradi, H., Desal, T., Morrison, C.J., 1999. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3332-3337.
- Barrientos, A., 2003. Yeast models of human mitochondrial diseases. *JUBMB Life* 55, 83-95.
- Bazin, I., Faucet-Marquis, V., Monje, M.C., Khoury, M.E., Marty, J.L., Pfohl-Leszkowicz, A. 2013. Impact of pH on the stability and the cross-reactivity of ochratoxin A and citrinin. *Toxins.* 5, 2324-2340.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497-516.
- Berndt, O.W., 1983. Transport of citrinin by rat renal cortex. *Arch. Toxicol.* 54, 35-40.
- Betina, V., Baráthová, H., 1968. Citrinin- an inducer of permeability changes in *Eremothecium ashbyi*. *J. Antibiot.* 21, 628-629.
- Blaskó, Á., Mike, N., Gróf, P., Gazdag, Z., Czibulya, Zs., Nagy, L., Kunsági-Máté, S., Pesti, M., 2013. Citrinin-induced fluidization of the plasma membrane of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food Chem. Toxicol.* 59, 636-642.
- Boulimi, A., Bouaziz, C., Ayed-Boussema, I., Hassen, W., Bacha, H., 2008. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicol.* 251, 1-7.

- Cannon, W.B., 1973. Physiological regulation of normal states: some tentative postulates concerning biological homeostatics. In: Langley, L.L., (ed), Homeostasis. Origins of the Concept. Dowden, Hutchinsonson & Ross, pp. 246-249.
- Carlton, W.W., Sansing, G.M., Szczech, G.M., Tuite, J., 1974. Citrinin mycotoxins in Beagle dogs. Food Cosmet. Toxicol. 12, 479-490.
- Carmel-Harel, O., Storz, G., 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction system in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. Annu. Rev. Microbiol. 54, 439-461.
- Carmelo, V., Santos, H., Sá-Correia, I., 1997. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1325, 63-70.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem. Tox. 51, 15-25.
- Carter, W.O., Narayanan, P.K., Robinson, J.P., 1994. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. J. Leuko. Biol. 55, 253-258.
- Chagas, G.M., Campello, A.P., Klüppel, L.W., 1992a. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. J. Appl. Toxicol. 12, 123-129.
- Chagas, G.M., Oliveira, B.M., Campello, A.P., Klüppel, M.L., 1992b. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effect on respiration, enzyme activities, and membrane potential of liver mitochondria. Cell. Biochem. Funct. 10, 209-216.
- Chagas, G.M., Oliveira, M.A., Campello, A.P., Klüppel, M.L., 1995. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. IV. Effect on Ca²⁺ transport. Cell. Biochem Funct. 13, 53-59.
- Chan, W.H., 2007. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. Biochem. J. 404, 317-326.
- Chan, W.H., Shiao, N.H., 2007. Effects of citrinin on mouse embryonic development in vitro and in vivo. Reprod. Toxicol. 24, 120-125.
- Chang, C.H., Yu, F.Y., Wu, T.S., Wang, L.T., Liu, B.H., 2011. Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells. Toxicol. Sci. 119, 84-92.
- Chen, D., Wilkinson, C.R.M., Watt, S., Penkett, C.J., Toone, W.M., Jones, N., Bahler, J., 2008. Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. Mol. Biol. Cell 19, 308-317.

- Chen, C.C., Chan, W.H., 2009. Inhibition of citrinin-induced apoptotic biochemical signaling in human hepatoma G2 cells by resveratrol. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3338-3357.
- Chiu, D.T.Y., Stults, F.H., Tappel, A.L., 1976. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 445, 558-566.
- Christoperson, S.W., Glass, R.L., 1969. Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J. Dairy Sci.* 52, 1289-1290.
- Covey, E.S., Matsuda, S.P.T., Bartel, B., 1993. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11628-11632.
- Cram, D.J., 1950. The stereochemistry and ultraviolet absorption spectrum of citrinin. *J. AOAC.* 69, 957-959.
- Czakó-Vér, K., Batic, M., Raspor, P., Sipiczki, M., Pesti, M., 1999. Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 109-115.
- Demel, R.A., Bruckdorfer, J.M., Van Deenen, L.L.M., 1972. The effect of sterol structure on the permeability of lipomes to glucose, glycerol and Rb^+ . *Biochem. Biophys. Acta* 255, 321-330.
- Dombrink-Kurtzman, M.A., Blackburn, J.A. 2005. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 241-248.
- Dönmez-Altuntas, H., Dumlupinar, G., Imamoglu, N., Hamurcu, Z., Liman B.C., 2007. Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. *J. Appl. Toxicol.* 27, 337-341.
- Duran, A., Perez, P., 2004. Cell wall synthesis. In: Egel, R., (ed), *Molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer-Verlag, Berlin Heideberg, pp. 269-279.
- Eamann, M., Deleu, M., 2010. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14, 719-736.
- Emri, T., Bartók, G., 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., Szentirmai, A., 1997. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radical Bio. Med.* 23, 809-814.
- Endo, A., Kuroda M., 1976. Citrinin, an inducer of cholesterol synthesis. *J. Antibiot.* 29, 841-843.

- Espindola, A.S., Gomes, D.S., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2003. The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiol.* 47, 236-241.
- Fekete, A., Emri, T., Gyetvai, Á., Gazdag, Z., Pesti, M., Varga, Zs., Balla, J., Cserháti Cs., Emódy, L., Gergely, L., Pócsi, I., 2007. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 7, 834-847.
- Fekete, A., Pócsi, I., Emri, T., Gyetvai, Á., Gazdag, Z., Pesti, M., Karányi, Zs., Majoros, L., Gergely, L., Pócsi, I., 2008. Physiological and morphological characterization of tert-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *J. Basic Microbiol.* 48, 1-8.
- Flajs, D., Peraica, M., 2009. Toxicological properties of citrinin. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 60, 457-464.
- Flajs D., Želježić D., Mladinić M., Peraica M., 2010. Effects of citrinin treatment on oxidative stress in rat kidney. *Toxicol. Lett.* 1, 196. Doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.799
- Fliege, R., Metzler, M., 1999. The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and α -amino groups. *Chem-Biol. Interact.* 123, 85-103.
- Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A.C., Lopes, S.C.D.N., Antunes, F., Cyrne, L., Marinho, H.S., 2008. H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1141-1147.
- Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A., Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 1-12.
- Forsburg, S.L., 2005. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit. Space Res.* 18, 3-10.
- Forslund, K., Schreiber, F., Thanintorn, N., Sonnhammer, E.L.L., 2011. OrthoDisease: tracking disease gene orthologs across 100 species. *Brief. Bioinform.* doi:10.1093/bib/bbr024
- Gancedo, C., Gancedo, J.M., Sols, A., 1968. Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *Eur. J. Biochem.* 5, 165-172.
- Gasch, A.P., 2003. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stress. In: Hohmann, S., Mager, W.H., (Eds.), *Topics in Current Genetics Vol.1. Yeast Stress Responses*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 11-70.
- Ghannoum, M.A., Rice, L.B., 1999. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 501-517.
- Gille, G., Sigler, K., 1995. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol.* 40, 131-152.
- Girotti, A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529-1542.

- Golli-Bennour, E.E., Bacha, H., 2011. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: mycotoxins' exploration. *Toxicol.* 287, 1-7.
- Golli, E.E., Hassen, W., Bouslimi, A., Bouaziz, C., Ladjimi, M.M., Bacha, H., 2006. Induction of Hsp 70 in Vero cells in response to mycotoxins. Cytoprotection by sub-lethal heat shock and by Vitamin E. *Toxicol. Lett.* 166, 122-130
- Gómez, E.B., Forsburg, S.L., 2004. Analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle. *Methods Mol. Biol.* 241, 93-111.
- Grimm, C, Kohli, J, Murray, J, Maundrell, K., 1988. Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. *Mol. Gen. Genet.* 215, 81-86.
- Gupta R.C., 2007. Ochratoxins and citrinin. In: Gupta R.C., (ed), *Veterinary Toxicology, Basic Clinical Principles*. Academic Press, Amsterdam, pp. 997-1003.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715-725.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York.
- Haraguchi, H., Hashimoto, Shibata, K., Taniguchi, M., Oi, S., 1987. Mechanism of antifungal action of citrinin. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1373-1378.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabisco, E., 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780, 1217-1235.
- Horváth, E., Papp, G., Belágyi, J., Gazdag, Z., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M., 2010. In vivo direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1898-1904.
- Howlett, N.G., 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.
- Hwang, O., 2013. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp. Neurobiol.* 22, 11-17.
- Ikner, A., Shiozaki, K., 2005. Yeast signalling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.* 569, 13-27.
- Inoue, Y., Kobayashi, S., Kimura, A., 1993. Cloning and phenotypic characterization of a gene enhancing resistance against oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 327-331.

- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S. and Kimura, A., 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 27002-27009.
- Iwahashi, H., Kitagawa, E., Suzuki, Y., Ueda, Y., Ishizawa, Y., Nobumasa, H., Kuboki, Y., Hosoda, H., Iwahashi, Y., 2007. Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and oligo DNA microarray. *BMC Genomic.* 8, 95-107.
- Iwaki, T., Lefuji, H., Hiraga, H., Hosima, A., et al., 2008. Multiple function of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiol.* 154, 830-841.
- Jamieson, D.J., 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.* 174, 6678-6681.
- 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 *S. pombe* *Biochem. Biophys. Res. Com.* 283, 908-914.
- Jiang, L., Sheikh, M. S., and Huang, Y., 2010. Decision making by p53: life versus death. *Mol. Cell. Pharmacol.* 2, 69-77.
- Johannessen, L.N., Nilsen, A.M., Lovik, M., 2007. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. *Toxicol. Lett.* 168, 103-112.
- Jones, C.M., Lawrence, A., Wardman, P., Burkitt, M.J., 2003. Kinetic of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. *Biochem. Soc. T.* 31, 1337-1339.
- Kálmán, N., Gazdag, Z., Čertík, M., Belágyi, J., Selim, S.A., Pócsi, I., Pesti, M., 2013. Adaptation to *tert*-butyl hydroperoxide at a plasma membrane level in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* parental strain and its *t*-BuOOH-resistant mutant. *J. Basic Microbiol.* 54, 215-225.
- Kazuhiro, T., Kenji, A., Tadashi, E., Katsumi, K., et al., 1998. Synthesis of macrocyclic phosphates as models of archaeal membrane lipids. monolayer and bilayer studies. *New J. Chem.* 22, 63-69.
- Klarić, M,S, Pepneljnjak, S., Rumora, L., Ljubanović, D., 2007. Cytotoxic and apoptotic effects of fumonisin B₁, beauvericin and ochratoxin A on porcine kidney PK-15 cells. *Toxicol. Lett.* 164, 59-60.
- Knutsen, J.H., Rein, I.D., Rothe, C., Stokke, T., Grallert, B., Boye, E., 2011. Cell-cycle analysis of fission yeast cells by flow cytometry. *PLoS ONE.* doi:10.1371/journal.pone.0017175

- Krasowska, A., Chmielewska, L., Gapa, D., Prescha, A., Vachová, L., Sigler, K., 2002. Viability and formation of conjugated dienes in plasma membrane lipids of *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula glutinis* and *Candida albicans* exposed to hydrophilic, amphiphilic and hydrophobic pro-oxidants. *Folia Microbiol.* 47, 145-151.
- Krasowska, A., Dziadkowiec, D., Lukaszewicz, M., Wojtowicz, K., Sigler, K., 2003. Effect of antioxidants on *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in superoxide dismutases. *Folia Microbiol.* 48, 754-760.
- Krejci, M.E., Bretz, N.S., Koechel, D.A., 1996. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]_{plasma}. *Toxicology* 106, 167-177.
- Kumar, R., Dwiedi, P.D., Dhawan, A., Das, M., Ansari, K.M., 2011. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. *Toxicol. Sci.* 122, 557-566.
- Kunimoto, M., Inoue, K., Nojinama, S., 1981. Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 646, 169-178.
- Lee, J., Dawes, I.W., Roe, J.H., 1995. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiol.* 141, 3127-3132.
- Lee, J., Kwon, E.S., Kim, D.W., Cha, J., Roe, J.H., 2002. Regulation and the role of Cu,Zn-containing superoxide dismutase in cell cycle progression of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 297, 854-862.
- Lee, J.C., Straffon, M.J., Jang, T.Y., Higgins, V.J., Grant, C.M. and Dawes, I.W., 2001. The essential and ancillary role of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* analysed using a grande gsh1 disruptant strain. *FEMS Yeast Res.* 1, 57-65.
- Lees, N.D., Kemple, M.D., Barbuch, R.J., Smith, M.A., Bard, M., 1984. Differences in membrane order parameter and antibiotic sensitivity in ergosterol-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 776, 105-112.
- Lees, N.D., Skaggs, B., Kirsch, D.R., Bard, M., 1995. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* – a review. *Lipids* 30, 221-226.
- Lewinska, A., Bartosz, G., 2008. A role for yeast glutaredoxin genes in selenite-mediated oxidative stress. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1182-1187.
- Liu, H., Kehrer, J.P., 1996. The reduction of glutathione disulfide produced by t-butyl hydroperoxide in respiring mitochondria. *Free Radical. Bio. Med.* 20, 433-442.
- Liu, S., Wang, D., Zhang, J., Zhang, J., Gong, M., Wang, C., Wei, N., Liu, W., Wang, Y., Zhao, C., Cui, Y., Hu, D., 2012. Citrinin reduces testosterone secretion by inducing apoptosis in rat Leydig cells. *Toxicol. in Vitro* 26, 856-861.
- Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharm.*

- Lu, Z.Y., Lin, Z.J., Wang, W.L., Du, L., Zhu, T.J., Fang, Y.C., Gu, Q.Q., Zhu, W.M., 2008. Citrinin dimers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-54. *J. Nat. Prod.* 71, 543-546.
- Martin, W., Lorkowski, G., Creppy, E.E., Dirheimer, G., Rösenthaller, R., 1986. Action of citrinin on bacterial chromosomal and plasmid DNA *in vivo* and *in vitro*. *Appl. Environ. Microb.* 52, 1273-1279.
- Martin, H.L., Teismann, P., 2009. Glutathione – a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J.* 23, 3263-3272.
- Mike, N., Papp, G., Čertik, M., Czibulya, Zs., Kunsági-Máté, S., Ember, I., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M., Gazdag, Z., 2013. Regulation of cytotoxic, non-estrogenic, oxidative stress-induced processes of zearalenone in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicon* 73, 130-143.
- Mutoh, N., Kawabata, M., Kitajima, S., 2005. Effects of four oxidants, menadione, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biochem.* 138, 797-804.
- Nakagawa, C. W., Yamada, K. and Mutoh, N., 1999. Identification of the catalase gene promoter region involved in superinduction in *Schizosaccharomyces pombe* caused by cycloheximide and hydrogen peroxide *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 373-378.
- NCCLS, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility, Testing of yeasts: Approved standard. national committee of clinical laboratory standards, Wayne, PA, USA.
- Nguyen, M.T., Tozlovanu, M., Tran, T.L., Pfohl-Leskowicz, A., 2007. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chem.* 105, 42-47.
- Oberley, L.W., Spitz, D.R., 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105, 457-464.
- Odds, F.C., 1988. Activity of cilofungin (LY121019) against *Candida* species in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 22, 891-897.
- Oh, J.M., Jeon, B.S., Yoon, B.I., Lee, K.S., Kim, B.H., Oh, S.J., Kim, S.K., 2012. Evaluation of hepatotoxicity and oxidative stress in rats treated with tert-butyl hydroperoxide. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1215-1221.
- Oya, Y., Yamamoto, K., 1988. The biological activity of hydrogen peroxide. IV. Enhancement of its clastogenic actions by coadministration of *L*-histidine. *Mutat. Res.* 198, 233-240.
- Papadakis, M.A., Workmann, C.T., 2014. Oxidative stress response pathways: fission yeast as archetype. *Crit. Rev. Microbiol.* DOI: 10.3109/1040841X.2013.870968

- Papp, G., Horváth, E., Mike, N., Gazdag, Z., Belágyi, J., Gyöngyi, Z., Bánfalvi, G., Hornok, L., Pesti, M., 2012. Regulation of patulin-induced oxidative stress processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3792-3798.
- Pedrosa, N., Matis, A.C., Cyrne, L., Antunes, F., et al., 2009. Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Bio. Med.* 46, 289-298.
- Pekmez, M., Arda, N., Hamad, I., Kiğ, C., Temizkan, G., 2008. Hydrogen peroxide-induced oxidative damages in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biologia* 63, 151-155.
- Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J.S., Hileman, E.O., Plunkett, W., Keating, M.J., Huang, P., 2003. Inhibition of mitochondrial respiration: A novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 37832-37839.
- Perry, G., Cash, A.D., Smith, M.A., 2002. Alzheimer disease and oxidative stress. *J. Biomed. Biotechnol.* 3, 120-123.
- Pesti, M., Gazdag, Z., Belágyi, J., 2000. In vivo interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane, as revealed by EPR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 375-380.
- Pesti, M., Gazdag, Z., Emri, T., Farkas, N., Koósz, Z., Belágyi, J., Pócsi, I., 2002. Chromate sensitivity in fission yeast is caused by increased glutathione reductase activity and peroxide overproduction. *J. Basic Microbiol.* 42, 410-421.
- Pesti, M., Horváth, I., Vigh, L., Farkas, T., 1985. Lipid content and ESR determination of plasma membrane order parameter in *Candida albicans* sterol mutants. *Acta Microbiol. Hung.* 32, 305-313.
- Pesti, M., Novák, R., 1984. Decreased permeability of glycerol in an ergosterol-less mutant of *Candida albicans*. *Acta Microbiol. Hung.* 31, 81-84.
- Pesti, M., Paku, S., Novák, E.K., 1982. Some characteristics of nystatin-resistant sterol mutants of *Candida albicans*. *Acta. Microbiol. Hung.* 29, 55-66.
- Peterson, G.L., 1983. Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91, 86-105.
- Pfeiffer, E., Groß, K., Metzler, M., 1998. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis* 19, 1313-1318.
- Pinto, M.C., Mata, A.M., Lopez-Barea, I., 1984. Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 1-12.
- Pócsi, I., Prade, R.A., Penninckx, M.J., 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 49, 1-76.
- Poljsak, B., Pócsi, I., Raspor, P., Pesti, M., 2010. Interference of chromium with biological systems in yeasts and fungi: a review. *J. Basic Microbiol.* 50, 21-36.

- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1499-1503.
- Qingqing, H., Linbo, Y., Yunqian, G., Shuqiang, L., 2012. Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 465-469.
- Quinn, J., Findlay, V.J., Dawson, K., Millar, J.B.A., Jones, N., Morgan, B.A., Toone, W.M., 2002. Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.* 13, 805-816.
- Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Inertv. Aging* 2, 219-236.
- Reinhard, H., Zimmerli, B., 1999. Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *J. Chromatogr.* 862, 147-159.
- Riberio, S.M.R., Chagas, G.M., Campello, A.P., Klüppel, L.W., 1997. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem. Funct.* 15, 203-209.
- Roggenkamp, R., Sahn, H., Wagner, F., 1974. Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett.* 41, 283-286.
- Royall, J.A.; Ischiropoulos, H., 1993. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochim. Biophys.* 302, 348-355.
- Sabater-Vilar, M., Maas, R.F.M., Gremmels, J.F., 1999. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutat. Res.* 444, 7-16.
- Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J., Doelen, M.A.M., Fink-Gremmels, J., 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathol.* 163, 81-90.
- Sabatinos, S.A., Forsburg, S.L., 2009. Measuring DNA content by flow cytometry in fission yeast. *Methods Mol. Biol.* 521, 449-461.
- Saran, M., Bors, W., 1991. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Klin. Wochenschr.* 69, 957-964.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.
- Schrammel, A., Gorren, A.C.F., Schmidt, K., Pfeiffer, S., Mayer, B., 2003. S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and •NO/O₂•⁻. *Free Radical Bio. Med.* 34, 1078-1088.
- Shi, X.G., Dalal, N.S., 1990. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 342-350.

- Siddiqui, R.A., Harvey, K., Stillwell, W., 2008. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. *Chem. Phys. Lipids* 153, 47-56.
- Simić, A., Manoljović, D., Šegan, D., Todorčić, M., 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules* 12, 2327-2340.
- Stefanovic, V., 1998. Balkan endemic nephropathy: a need for novel aetiological approaches. *Q. J. Med.* 91, 457-463.
- Takeda, K., Yoshida, T., Kikuchi, S., Nagao, K., Kokubu, A., Pluskal, T., Villar-Briones, A., Nakamura, T., Yanagida, M., 2010. Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3540-3545.
- Thanh, H.T., Beney, L., Simonin, H., Nguyen, T.X.S., et al., 2007. Toxicity of fatty acid hydroperoxides towards *Yarrowia lipolytica*: Implication of their membrane fluidizing action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 2256-2262.
- Tibbles, L.A., and Woodget J.R., 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1230-1254.
- Toone, W.M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B.A., Toda, T., Jones, N., 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev.* 12, 1453-1463.
- Tran, L.H., Miki, T., Kamakura, M., Izawa, S., Tsujimoto, Y., Miyabe, S., Inoue, Y., Kimura, A., 1995. Oxidative stress response in yeast: induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipid hydroperoxide in *Hansenula markii*. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 606-609.
- Tuite, M.F., Oliver, S.G., 1991. *Saccharomyces*. Plenum Press, New York.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335-344.
- Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y., Osawa, T., 1999. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 274, 2234-2242.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2003. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell B.* 39, 44-84.
- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., Mattanovich, D., 2005. Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1515-1521.
- Veal, E.A., Toone, W.M., Jones, N., Morgan, B.A., 2002. Distinct roles for glutathione S-transferase in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 277, 35523-35531.

- Vivancos, A.P., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M., Hidalgo, E. 2006. Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Mol. Genet. Genom.* 276, 495-502.
- Wang, G., Hong, Y., Johnson, M.K., Maier, R.J., 2006. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*. Protective roles of peroxiredoxins. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 1596-1603.
- Wang, W., Ballatori, N., 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50, 335-355.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical. Bio. Med.* 27, 612-616.
- Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C., Mannervik, B., 1985. Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol.* 113, 499-504.
- Wonisch, W., Hayn, M., Schaur, R.J., Tatzber, F., Kranner, I., Grill, D., Winkler, R., Bilinski, T., Kohlwein, S.D., Esterbauer, H., 1997. Increased stress parameter synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett.* 405, 11-15.
- Wu, T.S., Yang, J.J., Yu, F.Y., Liu, B.H., 2012. Evaluation of nephrotoxic effects of mycotoxins, citrinin and patulin, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4398-4404.
- Xu, B.J., Jia, X.Q., Gu, L.J., Sung, C.K., 2006. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control* 17, 271-285.
- Yu, F.Y., Liao, Y.C., Chang, C.H., Liu, B.H., 2006. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicol. Lett.* 161, 143-151.
- Zaied, C., Zouaoui, N., Bacha, H., Abid, S., 2012. Natural occurrence of citrinin in Tunisian wheat grains. *Food Control* 28, 106-109.

Weboldalak

1. http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation (elérhető: 2015. február 19.)
2. <http://joelhuberman.net/HubermanLabArchives/BIR572/YeastGeneticsLectureNotes.html> (elérhető: 2015. február 19.)

XIII. Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló, nemzetközi folyóiratban megjelent tudományos közlemények

Gazdag, Z., **Máté, G.**, Čertík, M., Türmer, K., Virág, E., Pócsi, I., Pesti, M., 2014. *Tert-Butyl hydroperoxide-induced differing plasma membrane and oxidative stress processes in yeast strains BY4741 and *erg5Δ**. J. Basic Microbiol. 54, 50-62. (2013 **IF 1,822**)

Máté, G., Gazdag, Z., Mike, N., Papp, G., Pócsi, I., Pesti, M., 2014. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Toxicon 90, 155-166. (2013 **IF 2,581**)

Az értekezésben nem szereplő, nemzetközi folyóiratba közlésre elküldött, illetve közlésre váró tudományos közlemények

Blaskó, Á., Gazdag, Z., Gróf, P., **Máté, G.**, Sárosi, Sz., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M. Effects of clary sage oil and its main components, linalool and linalyl acetate, on the plasma membrane of *Candida albicans*: An in vivo EPR study. (submitted)

Máté, G., Kovács, D., Gazdag, Z., Pesti, M. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of the antioxidant linalool in the human pathogen *Candida albicans*. (in manuscript)

Papp, G., **Máté, G.**, Mike, N., Gazdag, Z., Pesti, M. Regulation of antioxidant system in cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* after combined treatment with patulin and citrinin. (in manuscript)

Az értekezéshez kapcsolódó előadások és poszterek

Gazdag, Z., Kőszegi, B., Čertík, M., **Máté, G.**, Thürmer, K., Belágyi, J., and Pesti, M.: Examination of oxidative stress sensitivity and oxido-reduction state of *Saccharomyces cerevisiae Δerg5* ergosterol mutant. 39th Annual Conference on Yeasts, Smolenice, Szlovákia, 2011, p. 73, poster abstract.

Gazdag, Z., **Máté, G.**, Čertík, M., Kőszegi, B., Türmer, K., Belágyi, J., Pesti, M.: *Saccharomyces cerevisiae ΔERG5* ergosterin mutáns törzs oxidatív stressz érzékenységének és oxido-redukciós állapotának vizsgálata. V. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest, Magyarország, 2012, pp. 38-39, abstract of a lecture.

Máté, G., Blaskó, Á., Mike, N., Gazdag, Z., Papp, G., Nagy, L., Vágvölgyi, Cs., Pesti, M.: Cytotoxic effects of citrinin on the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. ISM-Mycored International Conference Europe 2013., Martina Franca, Olaszország, 2013, p. 273, poster abstract.

Máté, G., Gazdag, Z., Papp, G., Mike, N., Pócsi, I., Pesti, M.: Citrinin-induced unbalanced oxido-reduction state of *Schizosaccharomyces pombe* cells. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Magyarország, 2013, pp. 184-185, abstract of a lecture.

Máté, G., Gazdag, Z., Mike, N., Papp, G., Pócsi, I., Pesti, M.: Regulation of citrinin-induced oxidative stress processes in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, Magyarország, 2013, pp. 207-209, abstract of a lecture.

Egyéb konferencia előadások és poszterek

Máté, G.: *Saccharomyces cerevisiae* Δ ERG6 mutáns oxidatív stressz érzékenységének vizsgálata. Szentágothai János Szakkollégium Tudományos Konferencia, Pécs, Magyarország, 2011, előadás.

Máté, G.: *Saccharomyces cerevisiae* Δ ERG6 mutáns oxidatív stressz érzékenységének vizsgálata. TÁMOP 4.3.2. „Nyitott Egyetem – a PTE tudásbázisának disszeminációja“, Pécs, Magyarország, 2011, előadás.

Blaskó, Á., Gazdag, Z., Gróf, P., **Máté, G.**, Sárosi Sz., Czuni, L., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs. and Pesti, M.: Effects of clary sage oil and its main components linalool and linalyl acetate on *Candida albicans*. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Magyarország, 2013, pp. 119-120, abstract of a lecture.

Mike, N., Papp, G., Gazdag, Z., **Máté, G.**, Czibulya, Zs., Kunsági-Máté, S., Čertik, M., Pesti, M.: Non-estrogenic, oxidative stress inducing effects of the mycotoxin zearalenone in the fission yeast. II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, Magyarország, 2013, pp. 205-206, abstract of a lecture.

Mike, N., Papp, G., Gazdag, Z., **Máté, G.**, Czibulya, Zs., Kunsági-Máté, S., Čertik, M., Pesti, M.: The oxidative stress inducing ability of zearalenone – a non-estrogen specific effect in the fission yeast. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Magyarország, 2013, p. 188, abstract of a lecture.

Mike, N., Papp, G., Gazdag, Z., **Máté, G.**, Türmer, K., Czibulya, Zs., Kunsági-Máté, S., Ember, I., Vágvölgyi, Cs., Čertik, M., Pesti, M.: Cytotoxic effects of zearalenone mycotoxin on the cells of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 30th International Specialised Symposium on Yeast. Stará Lesná, Szlovákia, 2013, p. 89, poster abstract.

Mike, N., Papp, G., Gazdag, Z., **Máté, G.**, Türmer, K., Czibulya, Zs., Kunsági-Máté, S., Ember, I., Vágvölgyi, Cs., Čertik, M., Pesti, M.: Regulation of zearalenone-induced oxidative stress process in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 7th International Fission Yeast Meeting. London, Egyesült Királyság, 2013, p. 186, poster abstract.

Papp, G., **Máté, G.**, Mike, N., Gazdag, Z., Balogh, A., Pesti, M.: Synergistic interactive effects of patulin and citrinin mycotoxins in fission yeast. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Magyarország, 2013, p. 210, abstract of a lecture.

Blaskó, Á., Gazdag, Z., Gróf, P., **Máté, G.**, Pesti, M.: Effects of clary sage oil and its main components linalool and linalyl acetate on the plasma membrane of *Candida albicans*: an *in vivo* EPR study. 30th International Symposium on Microscale Bioseparations, Pécs, Magyarország, 2014, p. 83, poster abstract.

Czuni, L., **Máté, G.**, Papp, G., Gwozdziński, K., Bartos, G., Krisch, J., Pesti, M., Gazdag, Z.: Antioxidant and antifungal effects of terpinen-4-ol on *Candida albicans*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 Promise Regional Meeting, Keszthely, Magyarország, 2014, pp. 11-12, poster abstract.

Papp, G., **Máté, G.**, Mike, N., Gazdag, Z., Pesti, M.: Investigation of the increased risk of mycotoxin combinations on fission yeast. XIth János Szentágothai and Ist László Cholnoky Interdisciplinary Conference. Pécs, Magyarország, 2014, p. 11, abstract of a lecture.

Az összes megjelent publikáció kumulatív impakt faktora (2013): 4,403