

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 tézisei

Máté Gábor

Témavezetők:

Prof. Pesti Miklós DsC
egyetemi tanár

Gazdag Zoltán PhD
egyetemi adjunktus

PÉCS, 2015

1. Bevezetés

A stressz felfogható a homeosztázissal ellentétes fogalomként, ahol a homeosztázis egy dinamikus egyensúlyi állapot a sejten belül, amelyben a sejteket pl.: az oxigén-felvétellel egy időben reaktív oxigén-származékok (ROS) hatása éri, de ez csak olyan mértékű, hogy a sejtet nem zavarja életfolyamataiban és szaporodásában. Ezen túlmenően a ROS-ok jelenléte számos fiziológias folyamathoz is elengedhetetlen. A stressz tehát ennek megváltozása, azaz egy kiegyensúlyozatlan homeosztázis. 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) valamilyen belső genetikai változás által (pl. mutáció, kromoszómaszám változás, stb.), melyek egyaránt oxidoredukciós változást okozhatnak. Ezen változások jelentőségét a legújabb kutatások is bizonyították: az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór, stb. egyaránt kapcsolatosak a redox egyensúly felbillenésével. Ezek a folyamatok oxidatív stresszt eredményeznek, amelyet a stressz erősségétől függően a sejtek az evolúció során kialakult folyamatok révén kompenzálni tudnak. Ezt a folyamatot adaptációnak nevezzük. Azonban, 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.

Disszertációmban mind a külső stressz, mind pedig a belső stressz modellezésére egy kísérleti rendszert állítottunk be, amelyekhez a petite-negatív, haploid hasadó élesztő *Schizosaccharomyces pombe*-t (*S. pombe*), illetve a petite-pozitív, haploid sarjadzó élesztő *Saccharomyces cerevisiae*-t (*S. cerevisiae*) 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; (ii) a króm kation szintén GSH-kimerülést és $^{\bullet}OH$ koncentráció növekedését okoz. 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.

2. Célkitűzések

A Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Karának Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékén már 1993 óta folynak oxidatív stresszel és membrándinamikával 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 kiáramláshoz. Erre alapozva, terveztük a CTN akut citotoxikus hatásának, oxidatív stresszt generáló hatásának vizsgálatát a haploid, eukarióta, *S. pombe* hasadó élesztőn.

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 szubinhibitori 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 transzkripciós 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 sejmag-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.

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 mutakozó 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 megnyilvánulásának vizsgálata a plazmamembrán fluiditásának szabályozásában. A plazmamembrán összetételének és biofizikai paramétereinek megváltozása feltételezi a membrán biológiai funkcióinak módosulását. Ennek ellenőrzése a sejtek glicerinaszimilációján keresztül.

2.3. Az *ERG5* gén mutációja által kiváltott kiegyensúlyozatlan 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.

3. Alkalmazott módszerek

A CTN hatásmechanizmusának vizsgálatához a *S. pombe* *ura4-D18 h⁻*, *uracil auxotróf*, heterotallikus törzset használtuk. A jelátviteli útvonal (MAPK) vizsgálatához a szülői törzset (*leu 1-32 ura4-D18 his 7-366 ade6-M210, h⁺*), valamint annak deléciós mutánsait: *Δatf1* (*atf1::ura4 leu 1-32 ura4-D18, h⁺*) és *Δpap1* (*pap1::ura4 leu 1-32 ura 4-D18, h⁺*) alkalmaztuk.

Az *ERG5* gén deléciója okozta kiegyensúlyozatlan oxidoredukciós állapot jellemzéséhez *S. cerevisiae* BY4741-es szülői törzsét (MATa, *his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0*) és annak ergoszterin bioszintézisben sérült *erg5Δ* mutánsát (*erg5Δ*; izogenikus a BY4741-gyel, YMR015c::kanMX4) használtuk.

Kísérleteinkhez közép-logaritmikus fázisú tenyészeteket használtunk, hogy a sejtek azonos fiziológiai állapotban legyenek. A sejtek gyűjtése, mosása minden esetben centrifugálással történt, 1017 g-n (3000 fordulat perc⁻¹), 5 percig. A vizsgálatokhoz használt

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

pH-függő citotoxikus hatás-, szaporodásgátlás-, pusztítás-, adaptáció- és felvétel-kinetika-meghatározása

A CTN *S. pombe*-ra gyakorolt szaporodásgátló hatását 0, 125, 250 és 500 μ M koncentrációk mellett; valamint a *t*-BuOOH *S. cerevisiae*-ra gyakorolt szaporodásgátló hatását 0, 0,4 és 0,6 mM koncentrációk mellett vizsgáltuk 10^6 sejt ml^{-1} induló sejtszámmal. A sejtosztódás mértékét az optikai denzitás meghatározásán keresztül végeztük spektrofotométerrel 595 nm-en. A CTN-nel szembeni MIC meghatározása standard mikrodilúciós módszer segítségével történt (5×10^3 sejt ml^{-1}) (NCCLS M27-A). A *S. pombe* és a MAPK mutáns törzsek érzékenységének vizsgálata, valamint a CTN pH-függő citotoxikus hatásának vizsgálata szintén a fenti szabvány szerint történt.

Az *erg5* Δ mutáns antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata foltoltással történt. A CTN és a *t*-BuOOH által előidézett sejtpusztulást, valamint a CTN-nel szemben kialakuló adaptációt szélesztésekkel határoztuk meg 10^7 db ml^{-1} sejtben.

10^7 db ml^{-1} sejtfalas *S. pombe* sejtet és protoplasztot 0,6 M-os KCl-ban 1000 μ M CTN-nel kezeltünk, és különböző időpontokban (0, 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 90 perc) mintát vettünk. A sejteket lecentrifugáltuk, a felülúszót 340 nm excitációs és 509 nm emissziós hullámhosszak mellett mértük és a kalibrációs görbe alapján meghatároztuk a sejtek által felvett CTN koncentrációját.

ROS-mérések

Az intracelluláris össz. ROS méréshez 10^7 db ml^{-1} sejtet jelöltünk 2',7'-diklorofluorescein diacetáttal (DCFDA), a peroxid gyök méréséhez dihidrorodamin 123-mal (DHR 123), míg a szuperoxid gyök méréséhez dihidroetidiummal (DHE). Az össz. ROS mérés Hitachi F-7000 spektrofluoriméterrel történt, a másik két ROS meghatározása pedig BD FACSCalibur áramlási citométer segítségével. A gerjesztési hullámhossz DCFDA esetében 502 nm, a detektálási hullámhossz pedig 525 nm volt. DHR 123 és DHE esetében az excitációs hullámhossz 488 nm volt, az emissziós hullámhossz a DHR 123 esetében 530 nm, míg a dihidroetidium esetében 585 nm volt.

Az antioxidáns enzimek specifikus aktivitásának és a glutation koncentrációjának a meghatározása

A glutation-reduktáz (GR), a glutation S-transzferáz (GST), a glutation-peroxidáz (GPx), a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD), a kataláz (CAT), a szuperoxid-dizmutázok (Cu/Zn-SOD és Mn-SOD) valamint az oxidált és redukált glutation intracelluláris

aktivitásának méréséhez, valamint a fehérjetartalom meghatározásához kolorimetriás vizsgálatokat alkalmaztunk.

Áramlási citometriás sejtciklus analízis és sejtgeomorfológiai vizsgálatok

A sejtciklus blokk vizsgálatához 10^7 sejt ml^{-1} szuszpenziót kezeltünk $1000 \mu\text{M}$ CTN-nel 60 percig, majd a sejtek előkészítését a megadott protokoll (ForsburgLab Protocols) szerint végeztük. A különböző fázisú sejtek vizsgálatához Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométert használtunk.

A sejtgeomorfológiai vizsgálatokhoz 10^7 sejt ml^{-1} szuszpenziót kezeltünk $1000 \mu\text{M}$ CTN-nel. $4\text{-}5 \mu\text{l}$ sejtuszuszpenziót szétoszlattunk tárgylemezen, majd beszáradás után $3 \mu\text{l}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) festékkel ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) jelöltük, és fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse 80i, UV szűrővel) vizsgáltuk a sejteket, majd fotókat készítettünk, átlagosan 300 sejtmagot vizsgáltunk mintánként.

Fluoreszcens anizotrópia meghatározása, lipid- és szterin-összetétel meghatározás és glicerín-asszimiláció vizsgálat

Egy órán keresztül 1 mM *t*-BuOOH-val kezelt, 10^7 sejt ml^{-1} sejt koncentrációjú *S. cerevisiae* tenyészetet 5 percen keresztül jelöltünk $2 \mu\text{M}$ TMA-DPH-val. Majd megmértük a mintákat 360 nm excitációs és 430 nm emissziós hullámhossz mellett, Perkin-Elmer fluoriméter segítségével.

Öt órán keresztül, 1 mM *t*-BuOOH-val kezelt, korai stacioner fázisú *S. cerevisiae* sejtekből (10^7 db ml^{-1}) a megfelelő protokoll alapján a teljes zsírsav- és szterin-tartalmat kiextraháltuk, gázkromatográfiával elemeztük, majd a kapott csúcsokat GC-MS analízissel meghatároztuk.

A BY4741-es szülői és *erg5Δ* mutáns törzsek glicerín-asszimilációját spektrofotometriásan mértük 595 nm -en.

4. Eredmények és értékelésük

A CTN pH-függő citotoxikus hatásának vizsgálata, szubinhítor koncentráció meghatározása, a CTN felvétel-kinetikája

Még 1987-ben Haraguchi és mtsai. kimutatták a toxin pH-függő citotoxikus hatását, miszerint savasabb pH-án a toxin erősebb hatással rendelkezik, de ezt azóta gyakorlatilag egyetlen publikációban sem vették figyelembe. Ezt leellenőrizendő, mikrodilúciós módszer segítségével vizsgáltuk a CTN pH-függő citotoxikus hatását. Eredményeink nem-lineáris dózis- és pH-függést mutattak. $\text{pH}=4,5$ -en a CTN MIC értéke $175 \mu\text{M}$ volt $\text{pH}=6,0$ -án pedig $1000 \mu\text{M}$.

CTN kezelés hatására koncentráció-függő szaporodásgátlást tapasztaltunk. A kontroll tenyészetrel szemben, a $125 \mu\text{M}$ -os CTN kezelés kismértékben késleltette a *S. pombe* sejtek

logaritmusos 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.

Pusztítási görbe felvételével meghatároztuk a további kezelésekre használt szubinhibítori koncentrációját a CTN-nek, amely 1000 μM -nak adódott. Ezzel a koncentrációval történő egy órás kezelés 21%-os pusztulást eredményezett (500 μM CTN kezelés 2%-os, míg 2000 μM CTN 98%-os pusztulást eredményezett).

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 pusztítási görbe felvételével megállapítottuk, és a további kísérletekben alkalmazott 1000 μM CTN-nek csak 30%-át vették fel az intakt sejtek 20 perc alatt, ami megkérdőjelezi az élesztők sejtfalának bioadszorpcióját. Azonban a sejtfa enzimikus eltávolítása után a CTN felvétel megkétszereződött (58%), ami arra enged következtetni, hogy a sejtfa gátolta a CTN felvételt. Az intakt sejteken és a protoplasztokon kapott telítési görbe alapján nincs a *S. pombe* sejtekben a CTN felvétel sebességével egyenértékű aktív transzport vagy a toxin lebontását végző metabolizmus.

A CTN oxidatív stressz-indukáló hatása és következményeinek vizsgálata

A szaporodásgátlási kísérlet alapján bizonyos mértékű adaptációs mechanizmust feltételeztünk. Ezért a szubinhibítori koncentrációval egy órán keresztül előkezeltük a sejteket, majd újbóli pusztítási görbét vettünk fel. Ennek eredményeként a pusztulás mértéke 21%-ról 2%-ra csökkent 1000 μM esetén, 98%-ról pedig 50%-ra 2000 μM esetén.

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 transzkripció faktor deléciós mutáns *pap1 Δ* és *atf1 Δ* törzsein. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, 250 μM CTN 47,1%-os növekedés gátlást okozott az *atf1 Δ* törzs esetében és 65,5% gátlást a *pap1 Δ* törzs esetében. Mindezek alapján a CTN-indukálta stresszfolyamat elsősorban a Pap1 transzkripció 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.

Egy óras, 1000 μM -os CTN kezelés hatására 2-szeres növekedést tapasztaltunk az össz. ROS koncentrációba, amely 1,5-szeres peroxid koncentráció növekedés következménye, mivel az intracelluláris $\text{O}_2^{\bullet-}$ tartalomban nem tapasztaltunk változást.

A CTN okozta peroxid akkumulációra válaszolva, a Pap1 és Atf1 transzkripció faktorok által szabályozva több változást figyeltünk meg az antioxidáns enzimek aktivitásában. A szerves peroxidokat (pl.: H_2O_2) semlegesítő CAT down-regulációját,

illetve a GSH peroxidok általi oxidációját katalizáló GPx up-regulációját figyeltük meg. A két enzim ellentétes szabályozása a peroxid és GSH túltermelés, valamint a GR down-regulációjának tudható be.

A CTN sejtciklusra gyakorolt hatását a DNS tartalom mérésével vizsgáltuk. Az egy órás, szubinhibítori CTN kezelés hatására a sejtciklus G1/G2/M-fázisában tartózkodó sejtek száma $85,01 \pm 2,00$ %-ról $77,82 \pm 3,30$ %-ra csökkent a G2/M-fázisblokknak köszönhetően. Ezzel párhuzamosan, az S-fázisú sejtek száma $11,18 \pm 1,91$ %-ról $16,62 \pm 2,60$ %-ra emelkedett, amely alapján feltételezhető a sejtciklus G2/M-fázisblokkja.

A sejtciklusban bekövetkezett blokk feltételez bizonyos mértékű DNS károsodást, amit fluoreszcens mikroszkópiával ellenőriztünk DAPI-val festett sejteken. Az egy órás, $1000 \mu\text{M}$ -os CTN kezelés 3,2-szeres növekedést eredményezett a fragmentált sejtmagok számában, a kontrollhoz viszonyítva.

Az *ERG5* gén mutációjának hatása a plazmamembránnal összefüggő folyamatokra

S. cerevisiae szülői, BY4741-es törzséhez viszonyítva, az ergoszterin bioszintézisben sérült mutáns törzsek (*erg5* Δ , 4 Δ , 5 Δ , és 6 Δ) szignifikánsan megnövekedett toleranciát mutattak amfotericin B-vel szemben. Ennek oka, hogy az amfotericin B a plazmamembránban fellelhető szterinek közül az ergoszterinnel képezi a legerősebb komplexet.

Az *erg5* Δ mutáns plazmamembránjában bekövetkezett változásokat fluoreszcens anizotrópia mérésekkel vizsgáltuk. A mutánsban tapasztalt, szignifikánsan magasabb r -érték alapján, az alkalmazott TMA-DPH fluorofór mobilitása lecsökkent a membránban, ami megnövekedett rigiditásról ad információt.

A mutáns törzs megnövekedett plazmamembrán rigiditásának hátterében egyrészt a totál szterin tartalom 49,8%-os növekedése, másrészt a poláris foszfolipidek telített zsírsavainak megemelkedése áll.

A plazmamembrán membránösszetétel megváltozása maga után vonta a sejtek csökkent glicerin felvételét

Az *erg5* Δ 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). A szülői BY4741-es törzshöz viszonyítva, az *erg5* Δ mutáns 2,5-szer nagyobb érzékenységet mutatott *t*-BuOOH-val szemben, valamint egy felborult oxidoredukciós állapotot mutatott. A kezeletlen mutáns sejtekben szignifikánsan lecsökkent a O₂^{•-} és a H₂O₂ koncentráció, ami a SOD_{Mn} és a CAT enzimek megnövekedett specifikus aktivitásának köszönhető. Az *erg5* Δ sejtekben nem változott sem a GSH koncentráció, sem pedig a GR specifikus aktivitás, azonban a GSSG koncentráció szignifikánsan megemelkedett és ez maga után vonta a GST specifikus aktivitásának növekedését.

A *t*-BuOOH kezelés plazmamembrán összetételre 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 telítetlen zsírsavakon kifejtett lipidperoxidációs hatását. Kezelés hatására 15-86%-os csökkenést tapasztaltunk a telítetlen/telített zsírsavak arányában.

A telített zsírsavak mennyiségi növekedése mellett, a totál szterin tartalom szignifikánsan lecsökkent mindkét *t*-BuOOH-kezelt törzs esetében. Ennek következtében, a fluoreszcens anizotrópia r -érték csökkenésének alapján a *t*-BuOOH kezelés fluidizáló hatást fejtett ki a törzsek plazmamembránjára. Azonban megemlítendő, hogy a szterin és zsírsav analízisből származó eredmények nem vethetőek össze direkt módon az anizotrópia mérésekből származó eredményekkel az eltérő kezelési idő miatt.

Kezelés hatására, a BY4741-es szülői törzsben a $O_2^{\bullet-}$ koncentráció 6,7-szeresére emelkedett, a mutánsban pedig 2,3-szeresére; a peroxidok mennyisége 6,8-szeresre a szülői sejtekben és 3,2-szeresre az *erg5* Δ mutánsban. A megnövekedett $O_2^{\bullet-}$ -ot H_2O_2 -vé alakító mitokondriális SOD_{Mn} specifikus aktivitása megemelkedett a szülői törzsben, a citoplazmás SOD_{CuZn} specifikus aktivitása pedig az *erg5* Δ mutánsban. 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 *erg5* Δ mutánsban pedig a GSH-GPx-GR útvonalon keresztül szabályozódott a *t*-BuOOH által kiváltott stresszhatás. Létezik a GST-nek olyan típusa, a szelén-független glutation-peroxidáz, amely rendelkezik GPx aktivitással és a szerves peroxidok (lipidperoxidok) semlegesítésében vesz részt. A BY4741-es *t*-BuOOH kezelt törzsben szignifikánsan megemelkedett a GST aktivitás.

5. 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 μ M volt, pH=4,5-en pedig a MIC₉₀ érték 175 μ M, mely utóbbi pH optimális az *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 további kezelésekhöz

szükséges szubinhibítori koncentrációját a toxinnak (1000 μM), ahol a vizsgált sejtek legalább 70%-ka életképes/szaporodóképes.

1.3. Jellemeztük a CTN felvétel-kinetikáját. Kimutattuk, hogy a sejtfall barrier funkciójának köszönhetően, az alkalmazott 1000 μM CTN-nek mintegy 30%-át veszik fel a sejtfallas vegetatív sejtek, 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 hátterében a peroxidok koncentrációjának 1,5-szeres emelkedése áll. A CTN által előidézett oxidatív stressz erősségének meghatározásához a H_2O_2 -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 szubinhibítori 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 hátterében 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 *pap1* Δ 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 növekedés ilyen sejtszám mellett egyértelmű, szemben azokkal, akik csökkenést mutattak ki. A GSH mennyiségi változását követte a GSH homesztázisért felelős enzimek (GPx, GR, G6PD, GST) aktivitása. H_2O_2 tekintetében a szakirodalommal megegyező antioxidáns választ kaptunk.

1.7. Az akkumulálódó ROS-ok hatására károsodott a sejtek örökítő állománya, 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 sejtciklus blokkját figyeltük meg.

Munkánk második részeként *S. cerevisiae* sarjadzó élesztő *erg5* Δ mutánsán, illetve annak szülői törzsén vizsgáltuk az *ERG5* gén deléciójának következményeit a plazmamembrán összetételére és funkciójára nézve, illetve a sejtek oxidoredukciós állapotára. 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 lipidperoxidációt okozó *t*-BuOOH-ra, aminek háttérében a lipidperoxidáció 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 $O_2^{\bullet-}$ és peroxid koncentrációk meghatározásán keresztül először bizonyítottuk azt, hogy az *ERG5* gén mutációja kiegyensúlyozatlan 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 aktivitás. A szignifikánsan magasabb GSSG koncentráció és GST specifikus aktivitás 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 fluiditás növekedését okozta, amely az össz. szterin tartalom *t*-BuOOH-indukálta csökkenésének a 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 homeosztázisért felelős enzimek up-regulációja, illetve megnőtt a CAT és SOD_{Mn} specifikus aktivitás. 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.

6. Publikációk

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., Türmer, K., Belágyi, J., and Pesti, M.: Examination of oxidative stress sensitivity and oxido-reduction state of *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta erg5$ 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* $\Delta ERG5$ 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* ΔERG6 mutáns oxidatív stressz érzékenységének vizsgálata. Szentágothai János Szakkollégium Tudományos Konferencia, Pécs, Magyarország, 2011, előadás.

Máté, G.: *Saccharomyces cerevisiae* ΔERG6 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, pp. 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., Bartosz, 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.

A már megjelent publikációk összesített impakt faktora (2013): 4,403