

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

A patulin és a zearalenon mikotoxinok által indukált oxidatív stressz folyamatok szabályzása hasadó élesztő sejtekben

PhD értekezés

Mike Nóra

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, 2014.

„ A tudomány sosem képes a természet végső rejtélyeit megoldani, mivel a rejtélynek mi magunk is részei vagyunk. ”

/Max Planck/

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke.....	5
II. Bevezetés	6
III. Irodalmi áttekintés	9
III.1. Az oxidatív stressz.....	9
III. 1.1. Az oxigén és a reaktív oxigén-származékok.....	9
III.1.2. Antioxidáns enzimek és nem enzimatisz molekulák.....	12
III.2. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	17
III.2.1. A <i>S. pombe</i> rendszertani besorolása.....	18
III.2.2. A <i>S. pombe</i> genetikája	18
III.2.3. A <i>S. pombe</i> életciklusa	18
III.2.4. A <i>S. pombe</i> sejtciklusa.....	19
III.2.5. A <i>S. pombe</i> oxidatív stresszre adott válaszána szabályzása.....	20
III.3. A mikotoxinok	23
III.3.1. A mikotoxinok és az oxidatív stressz	23
III.3.2. A zearalenon	25
III.3.2.1. Történeti áttekintés.....	25
III.3.2.2. Termelő törzsek	26
III.3.2.3. A ZEA fizikai és kémiai tulajdonságai, előfordulása.....	26
III.3.2.4. A ZEA hatása magasabbrendű eukarióta szervezetekre.....	27
III.3.2.5. A ZEA ösztrogén-specifikus sejt szintű hatása.....	27
III.3.2.6. A ZEA nem ösztrogén-specifikus sejt szintű hatása	28
III.3.3. A patulin	30
III.3.3.1. Történeti áttekintés.....	30
III.3.3.2. Termelő törzsek	31
III.3.3.3. A PAT fizikai és kémiai tulajdonságai, előfordulása.....	31
III.3.3.4. A PAT hatása magasabbrendű eukarióta szervezetekre	32
III.3.3.5. A PAT sejt szintű hatásai	32
IV. Célkitűzések	37
V. Anyag és módszer	39
V.1. A <i>S. pombe</i>	39
V.2. Törzsfenntartás, kezelés.....	39
V.3. Alkalmazott vegyszerek.....	39
V.4. Tápanyagok, tápanyagok	40
V.5. Növekedési görbe felvétele.....	40
V.6. A ZEA, a β -ösztradiol és a PAT minimális gátló koncentrációinak meghatározása	41
V.7. A ZEA felvétel-kinetikája.....	42
V.8. A szaporodásgátlás megállapítása	42
V.9. Pusztítási görbe felvétele	42
V.10. Az adaptáció vizsgálata.....	43
V.11. Az intracelluláris peroxid-koncentráció mérése	43
V.12. Az intracelluláris szuperoxid-koncentráció mérése	43
V.13. A minták előkészítése hidroxilgyök és enzimaktivitás mérésekhez	44
V.14. Az intracelluláris hidroxilgyök mérése	44
V.15. Glutation-koncentráció és enzimaktivitás mérések	45
V.15.1. A glutation-koncentráció mérése.....	45
V.15.2. Az oxidált glutation koncentrációjának mérése	45
V.15.3. A szuperoxid-dizmutázok specifikus enzimaktivitásának mérése	46
V.15.4. A kataláz specifikus enzimaktivitásának mérése	47
V.15.5. A glutation-peroxidáz specifikus enzimaktivitásának mérése	48
V.15.6. A glutation-reduktáz specifikus enzimaktivitásának mérése	48

V.15.7. A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz specifikus enzimaktivitásának mérése	49
V.15.8. A glutation-S-transzferáz specifikus enzimaktivitásának mérése	49
V.16. A fehérjetartalom mérése	49
V.17. A ZEA-GSH és a PAT-GSH közötti interakció	50
V.18. A G2/M fázisblokk vizsgálata	50
V.19. Sejtmag-morfológiai vizsgálatok	51
V.20. Az apoptózis és a nekrozis vizsgálata	51
V.21. Az össz-szterin-tartalom meghatározása gázkromatográfiával	52
V.22. Statisztikai analízis	52
VI. Eredmények	53
VI.1. Az ösztrogén receptor analógia vizsgálata	53
VI.2. Növekedési görbe felvétele és a generációs idő meghatározása	53
VI. 3. A ZEA-val végzett kísérletek eredményei	54
VI. 3.1. A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása	54
VI.3.1.1. A MIC ₅₀ értékének meghatározása	54
VI.3.1.2. A β-ösztradiol MIC-nek meghatározása	55
VI.3.2. Felvétel-kinetika	55
VI.3.3. A szaporodásgátlás meghatározása	56
VI.3.4. Pusztítási görbe felvétele	57
VI.3.5. Az adaptáció vizsgálata	57
VI.3.6. Az oxidatív stresszfolyamatok szabályzásának vizsgálata <i>S. pombe</i> deléciós mutáns törzseken	58
VI.3.7. Az intracelluláris peroxid-koncentráció	59
VI.3.8. Az intracelluláris szuperoxid-koncentráció	60
VI.3.9. A hidroxilgyök koncentrációjának meghatározása	60
VI.3.10. Az antioxidáns védekező rendszer változásai	61
VI.3.11. A ZEA és a GSH közötti interakció	61
VI.3.12. A G2/M fázisblokk vizsgálata	62
VI.3.13. Sejtmag-morfológiai változások	63
VI.3.14. Az apoptózis és a nekrozis vizsgálata	63
VI.3.15. Az össz-szterin tartalom változása	64
VI. 4. A PAT-tal végzett kísérletek eredményei	64
VI.4.1. Az oxidatív stressz-folyamatok szabályzásának vizsgálata <i>S. pombe</i> deléciós mutáns törzseken PAT kezelés hatására	64
VI.4.2. Sejtmag-morfológiai változások	65
VI.4.3. A PAT és a GSH közötti interakció	66
VII. Eredmények értékelése	67
VII.1. Az <i>S. pombe</i> törzs általános jellemzése	67
VII.2. A ZEA citotoxikus hatása az <i>S. pombe</i> ra	67
VII.3. A ZEA oxidatív stressz-indukáló hatásának vizsgálata	69
VII.4. A ZEA hatására bekövetkező sejtciklus-blokk és következményei	71
VII.5. A szterin-összetétel változásai ZEA-kezelés hatására	73
VII.6. A PAT citotoxikus hatása elleni védekezés a <i>S. pombe</i> ban	75
VIII. Összefoglalás	81
IX. Summary	83
X. Irodalomjegyzék	85
XI. Köszönetnyilvánítás	96
XII. Publikációs lista	97

I. Rövidítések jegyzéke

Caco-2	humán epiteliális kolorektális adenokarcinóma sejt kultúra
CAT	kataláz
CHO-K1	kínai hörcsög ovárium eredetű epiteliális sejt kultúra
DHR123	dihidrorodamin 123
EPR	elektron paramágneses rezonancia
ERK	extracelluláris szignál-szabályzott kináz
G6PD	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GCS	γ -glutamilcisztein-szintáz
GPx	glutation-peroxidáz
GR	glutation-reduktáz
GS	glutation-szintetáz
GSH	glutation
GSSG	glutation-diszulfid
GST	glutation S-transzferáz
HepG2	hepatocelluláris karcinoma sejt kultúra
HEK293	humán embrionális vese sejt kultúra
HL-60	humán promielitikus leukémia sejt kultúra
Hsp	hősokkfehérje
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LLC-PK1	sertés proximális tubulus hámsejt kultúra
MAPK	mitogén-aktivált protein-kináz
MDA	malondialdehid
MIC	minimális gátló koncentráció
$O_2^{\cdot-}$	szuperoxid gyök
$\cdot OH$	hidroxilgyök
PAT	patulin
PI	propidium-jodid
ROS	reaktív oxigén-származékok
SOD	szuperoxid-diszmutáz
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Srx1	szulfiredoxin
Tpx1	peroxiredoxin
Trx1	tioredoxin
Vero	afrikai zöldmajom vese sejt kultúra
ZEA	zearalenon

II. Bevezetés

Az emberi élelmiszerekben és az állati takarmányokban megjelenő toxikus anyagok igen jelentős része mikrobiális eredetű. Ezek közül a fonalas gombák által termelt mikotoxinok napjainkban egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert a mind intenzívebb nemzetközi terménykereskedelem és az éghajlat jelentős változásai miatt. Jelenleg több mint 300 mikotoxin ismert, amelyek közül azokra irányul leginkább a tudományos érdeklődés, amelyek karcinogének és/vagy nagyon toxikus hatásúak. Ilyen, közegészségügyi és mezőgazdasági szempontból is fontos mikotoxinok az aflatoxinok, az ochratoxinok, a trichotecének, a zearalenon, a fumonizinek, a patulin és az ergot-alkaloidok. Ezek a toxinok évente több millió dolláros károkat okoznak világszerte, amely főként az orvosi és állatorvosi költségekben, valamint a menthetetlen mezőgazdasági termények miatt fellépő anyagi kárban nyilvánul meg. Egy, a Food And Drug Administration (FDA) által 2003-ban közölt adat szerint az aflatoxinok, a fumonizinek és a deoxinivalenol okozta terményvesztésből adódó károk az USA-ban elérték a 932 millió amerikai dollárt. Ezeknek a gazdasági és élelmezés-egészségügyi szempontból fontos vegyületeknek az élelmiszerekben, takarmányokban maximálisan megengedett koncentrációit szigorú nemzetközi és hazai szabályok szerint ellenőrzik. A mikotoxinok intracelluláris, molekuláris szintű hatásainak és az általuk előidézett stressznek a megismerésével, valamint a toxinok támadáspontjainak azonosításával megalapozhatjuk azt a tudást, amelynek segítségével az élelmiszerek és takarmányok toxinmentesítése, a mikotoxikózisok gyógyítására alkalmazott terápiaák kifejlesztése és hatékonyságának növelése, esetleges rezisztens haszonnövények nemesítése megvalósítható (Bennett és Klich, 2003; Zain 2010; Omar, 2013).

A Földön minden élőlény igyekszik kialakítani belső egyensúlyát, homeosztázisát azáltal, hogy alkalmazkodik a külső és belső környezet változásaihoz, ezáltal biztosítja a szervezet vagy – egysejtű fajok esetén a sejt – dinamikus állandóságát. Ha a változások túl nagyok, kilépnek az optimumból, felborul a dinamikus egyensúly és ez stresszként hat az élő szervezetekre. Eredetét tekintve a stresszhatás lehet belső (mutáció, intracelluláris parazita, stb.) vagy külső (pl. nehézfémek, toxinok, hőmérséklet, oxigén-ellátottság, pH, tápanyag elérhetőség, ozmotikus nyomás változásai, patogének, UV sugárzás stb.), amelyekhez bizonyos határok között az élőlények képesek alkalmazkodni. Ezt az alkalmazkodást adaptációnak nevezzük, kialakításában pedig összehangolt molekuláris mechanizmusok vesznek részt.

A disszertációban modellszervezetként használt egysejtű, eukarióta, haplonta hasadó élesztő, a *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) egyike a biológiai kutatásokban legáltalánosabban alkalmazott modellszervezeteknek. Egy adott külső stresszt kiváltó stresszor (pl. egy adott mikotoxin) hatására a sejtek válaszreakciói rövid idő alatt megjelennek és tanulmányozhatóak. A mintegy háromszáz ismert mikotoxin egy része sejtpusztító citotoxikus folyamatokban oxidatív stressz-állapotot okoz. Az oxidatív stresszfolyamatok megismerésének különösen nagy jelentősége van, hiszen számos humán betegség (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór, sclerosis multiplex, ízületi gyulladások és gyulladásos bélbetegségek, kardiovaszkuláris megbetegedések, arteriosclerosis) egyaránt erre a folyamatra vezethető vissza.

Az élesztő sejtek a megfelelő receptorok segítségével képesek érzékelni a megváltozott körülményeket, különböző jelátviteli útvonalakat aktiválnak, amelyek úgy változtatják a sejtek génexpressziós profilját, hogy a védekezésben résztvevő antioxidánsok (pl. peptidek, vitaminok, flavonoidok és karotinoidok: glutation, aszkorbinsav, tokoferol, β -karotin, stb.), és antioxidáns enzimek (pl. kataláz, szuperoxid-dizmutáz, glutation-peroxidáz, glutation-reduktáz, glutation S-transzferáz, stb.) aktiválása segítse a túlélést és a megváltozott körülményekhez való adaptációt. A stresszre adott válaszok közt megkülönböztetünk általános környezeti stresszválaszt és specifikus környezeti stresszválaszt. A központi válasz megegyezik a legtöbb stressz esetében, tehát különböző stresszhatások ugyanazt a védekező mechanizmust aktiválhatják azáltal, hogy azonos jelet generálnak, amely azonos transzkripciós faktorokat fog aktiválni, így kialakítva egy általános stresszválaszt. Ebben az esetben olyan gének expressziója indukálódik, amelyek a szénhidrát-metabolizmusban, a reaktív oxigén-származékok semlegesítésében, a megfelelő fehérjeszerkezet kialakításában, a mitokondriális funkciókban és a metabolit-transzportban érintettek. Ezzel szemben a specifikus válaszban olyan gének indukálódnak, amelyeknek sokkal specifikusabb szerepük van az adaptációban. Az adaptáció lehet többszintű, annak megfelelően, hogy csak a károsodások (pl. mutációk) kialakulását gátolja, vagy teljes alkalmazkodást biztosít a megváltozott környezethez, esetleg későbbi, nagyobb mértékű stresszel szemben is rezisztenssé teszi a sejtet (Lee és mtsai., 1997; Chen és mtsai., 2003; Halliwell és Gutteridge, 2007).

A mikotoxinok hatásmechanizmusának vizsgálatához éppen ezért választottuk modellorganizmusnak a *S. pombe*-t, hiszen komplex vizsgálati módszerekkel rendelkezünk az oxidatív stressz-folyamatainak és azok szabályzásának vizsgálatát illetően. A *S. pombe* több szempontból is megfelelő modellorganizmusnak bizonyult,

hiszen sejtosztódása és a sejtciklus szabályzása nagyon hasonló a magasabbrendű eukarióta sejtekhez, számos génje szignifikáns hasonlóságot mutat humán betegségeket hordozó génekkel, és a stressz-aktivált jelátviteli útvonal aktiválódási profilja megegyezik az emlős útvonalakéval.

Az általunk vizsgált két mikotoxin, a patulin (PAT) és a zearalenon (ZEA) eltérő támadáspontú vegyületek, azonban irodalmi adatok azt valószínűsítik, hogy a hatásmechanizmusukban az oxidatív stressz meghatározó folyamat, amely lényegének megértése azonban további kutatásokat igényel. A PAT esetében kutatócsoportunk korábban már részletesen vizsgálta a toxin oxidatív stressz generáló hatását, azonban a *S. pombe* stresszválasza, illetve az oxidatív stressz következtében a DNS-t ért esetleges károsodások még ismeretlenek voltak. A ZEA esetében a kutatások jelentős része annak ösztrogén-analóg hatására és az ebből adódó komoly egészségkárosító hatásaira fókuszál. Azonban bizonyos irodalmi adatok (pl. hosszú távú akut tesztekben a GSH mennyiségi csökkenése, az össz-ROS emelkedés, néhány antioxidáns enzim – pl. SOD, CAT, GPx – specifikus enzimaktivitás változásai) arra utalnak, hogy az oxidatív stressz generáló hatása is komoly szerepet játszik toxicitásában. Ezen adatok kapcsán merült fel bennünk kérdésként, hogy vajon a különböző eredetű és aktivitású ROS-ok milyen mértékben vesznek részt az oxidatív stressz generáló folyamatban, valamint hogy a kialakuló stresszel szemben hogyan védekezik a sejt, és milyen szabályzási folyamatok állnak mindezek mögött? A ZEA esetében kulcskérdés volt, hogy az oxidatív stresszre utaló eredmények összefüggésben vannak-e annak ösztrogén-analóg hatásával? Az általunk vizsgált két toxin hatásairól már ismert adatok nagyon különböző sejt- és szövettípusokon, élőlényeken elvégzett kísérletekből erednek, így egy toxin hatásairól kapott információk igen eltérőek lehetnek. Egy jól definiált modellen vizsgálva őket azonban az általunk kapott eredmények összehasonlíthatóak.

III. Irodalmi áttekintés

III.1. Az oxidatív stressz

A környezet - legyen az külső vagy belső - hat az élőlényekre, és folyamatosan változik. Ezzel párhuzamosan az élőlényeknek a dinamikus egyensúly fenntartása érdekében folyamatosan követni kell ezeket a változásokat, érzékelni őket, és reagálni rájuk. Az egysejtű élőlényeket a külső stresszhatások azonnali válaszcímra kényszerítik. A megfelelő reagálásához szükség van receptorokra, amelyek érzékelik a stresszhatást, jelátviteli útvonalakra, amelyek továbbítják az információt a sejtben belül és kompenzációs mechanizmusokat indukálnak a sejt fiziológiai folyamataiban. Ezek a folyamatok elengedhetetlenek ahhoz, hogy a sejt alkalmazkodjon, és ezáltal túlélje az adott hatást a változó környezeti feltételek között (Chen és mtsai., 2003; Scandalios, 2005).

Ezek a védekező mechanizmusok magasan konzerválódtak az eukariótákban, nagyon hasonlóak az élesztőtől az emberig. A stressz-aktivált jelátviteli útvonalaknak kulcsszerepük van az adaptációs folyamatokban. Normál esetben az aerob szervezetekben a reaktív oxigén-származékok (ROS) képződése dinamikus egyensúlyban van az antioxidáns védekező rendszer működésével. Az egyensúly azonban soha nem tökéletes, ezért minimális ROS-közvetített károsodás folyamatosan előfordul, így pontosabb az a megállapítás, hogy az antioxidáns védekező rendszer sokkal inkább szabályozza a ROS-ok mennyiségét, mint hogy eliminálja őket. Ha az elérhető antioxidánsok mennyiségéhez képest jelentősen megnövekszik a ROS-ok mennyisége, tehát amikor a prooxidáns-antioxidáns egyensúly felborul, akkor beszélünk oxidatív stresszről. Az egyensúly megzavarása károsodásokat von maga után, amelyeket, ha a ROS-ok okozzák, oxidatív károsodásnak nevezünk. Oxidatív stresszt eredményezhet az antioxidánsok mennyiségének lecsökkenése vagy a megemelkedett ROS-termelés is.

Az oxidatív stresszre adott válaszcímként intenzívebbé válhat a sejtek osztódása, a védekező rendszerek erős aktivizálásával adaptálódhatnak, de sérülhetnek is, amely esetben bármely sejtalkotó és molekula érintett lehet. Ha a sérülés kijavíthatatlan marad, az sejtáthalálhoz vezethet (Halliwell és Gutteridge, 2007).

III.1.1. Az oxigén és reaktív oxigén-származékok

Az anaerob környezeti feltételekhez alkalmazkodott mikroorganizmusokon kívül minden élőlénynek szüksége van oxigénre a hatékony energiatermeléshez. A Föld atmoszférájában körülbelül 2,5 milliárd évvel ezelőtt jelent meg jelentős mennyiségben a

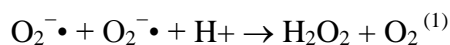
szabad oxigén a fotoszintetizáló, oxigént előállító cianobaktériumoknak köszönhetően. Azonban, ahogy az atmoszférában emelkedett az oxigén mennyisége, az élő szervezetek ki lettek téve az oxigén toxikus hatásának, a sejtekben lejátszódó oxidáció ugyanis káros, akár halálos is lehet, ezért az élőlények az evolúciós nyomás alatt védekező mechanizmusokat fejlesztettek ki az oxigén káros hatásaival szemben (Halliwell és Gutteridge, 2007).

Elsőként Gershan és mtsai. (1954) írták le, hogy az oxigén toxikus hatása a szabadgyök-képző képességén alapul. Szabadgyöknek nevezünk minden olyan formát, amely egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaz (párosítatlan az elektron, ha egyetlen elektron foglal el egy atomi vagy molekuláris orbitált). Ugyanakkor az oxigénnek vannak nem gyökös formái is, amelyek szintén erősen reaktívak (pl. gerjesztett szinglett állapot vagy a szerves hidroperoxidok), így használatos a reaktív oxigén-fajták megnevezés is (Halliwell és Gutteridge, 2007; Gille és Sigler, 1995).

A sejtek, szervezetek normál anyagcseréje során, valamint különböző környezeti zavarások következményeként (pl. extrém hőmérséklet, sugárzás, xenobiotikumok, toxinok, biotikus- és abiotikus stresszorok) is termelődnek ROS-ok és szabadgyökök (Scandalios, 2005). A sejtekben a mitokondrium a fő molekuláris oxigén-fogyasztó, éppen ezért fontos szerepet játszik a toxikus oxigénformák előállításában. A molekuláris oxigén négy-elektron redukcióját a citokróm-oxidáz komplex végzi, melynek végtermékeként víz képződik, és ezen folyamatok közben nem alakulnak ki szabadgyökök. Az elfogyasztott oxigénnek azonban kb. 1,5%-a nem redukálódik vízzé a citokróm-oxidáz komplex segítségével, hanem végigmegy egy lépcsőzetes egy-elektron redukció soron, amelyet az elektron-elszivárgások okoznak a légzési láncot megelőző lépésekben. Ez a folyamat állít elő reaktív oxigén-származékokat, de más folyamatok is elektron-donorként szolgálhatnak az oxigén redukációjához. Ezeknek a folyamatoknak az első terméke általában a szuperoxid gyök (Gille és Sigler, 1995).

A **szuperoxid gyök** ($O_2^{\cdot-}$) legfontosabb forrása az élő szervezetben a mitokondrium elektrontranszport lánc, az endoplazmatikus retikulum és a kloroplasztisz. Egy elektron hozzáadódik az alapállapotú O_2 -molekulához, amelyből így kialakul a $O_2^{\cdot-}$. Az endoplazmatikus retikulumban található citokróm és a flavoproteinek szintén képesek elektront szivárogtatni az oxigénre, $O_2^{\cdot-}$ -t alakítva ki. Emellett $O_2^{\cdot-}$ kialakulhat a sejtek normális autooxidációs folyamatai során is, illetve számos enzim (xantin-oxidáz, NADPH-oxidáz) redukciós működése közben. A $O_2^{\cdot-}$ vizes közegben nem túl reaktív, önmagában alig vagy egyáltalán nem reagál a legtöbb biomolekulával. Káros hatásainak kifejtéséhez általában szükség van más gyökökkel (pl. NO^{\cdot} , vas-kén tartalmú fehérjék ionjai, $HOCl$)

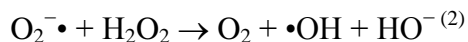
való reakcióhoz is. A reakciói gyorsak, és gyorsan eltűnik a diszmutációs reakcióknak köszönhetően, melyek során egy $O_2^{\cdot-}$ O_2 -né oxidálódik, egy másik $O_2^{\cdot-}$ pedig H_2O_2 -dá redukálódik.



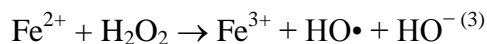
Mivel a $O_2^{\cdot-}$ töltéssel rendelkezik, nem képes áthatolni a membránokon, csak az anioncserélő fehérjéken keresztül, amelyek csak bizonyos sejttípusokban (pl. eritrociták) találhatóak meg (Gille és Sigler, 1995; Halliwell és Gutteridge, 2007).

Minden olyan rendszer, amely szuperoxid gyököt termel, **hidrogén-peroxidot** (H_2O_2) is előállít a $O_2^{\cdot-}$ diszproporcionálásával. Ez megtörténhet nem enzimatikusan hidroperoxil gyökök (HO_2^{\cdot}) részvételével, illetve a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek által katalizált módon. A $O_2^{\cdot-}$ -t termelő folyamatokon kívül a flavin-tartalmú oxidázok direkt módon is termelnek H_2O_2 -t. A H_2O_2 nem rendelkezik párosítatlan elektronnal, tehát nem gyök, viszont reaktív oxigén-származék. A $O_2^{\cdot-}$ -vel ellentétben a H_2O_2 minden biológiai membránon át tud jutni az akvaporin-csatornákon keresztül, így a termelődési helyétől messze is ki tud váltani gyökös reakciókat. Maga a H_2O_2 azonban gyenge oxidáló illetve redukáló molekula. Gyenge reaktivitása ellenére azonban magas koncentrációban citotoxikus lehet, és direkt módon is okozhat celluláris károsodásokat (pl. képes adduktumokat kialakítani több biokémiai rendszer komponenseivel). A legtöbb káros hatásáért azonban nem önmagában felelős. Átjutva a membránokon, reakcióba léphet vas- és réz-ionokkal, mely folyamatok közben egy sokkal reaktívabb gyök, a hidroxilgyök ($\cdot OH$) képződik (Gille és Sigler, 1995; Halliwell és Gutteridge, 2007).

A $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 reaktivitása viszonylag alacsony, ezért az általuk okozott sejtkárosodások általában az erősen reaktív **hidroxilgyökké** ($\cdot OH$) alakulásuk után következnek be. A $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 reakciója az ún. Haber-Weiss reakció:



A legfontosabb $\cdot OH$ -termelő ágensek a redox fémek (pl. Fe^{2+} , $Cr(VI)$, stb.). A Fe^{2+} biológiai rendszerekben szabad formában nem található meg, csak kötésekkben, amelyeket fehérjékkel, membránokkal, nukleinsavakkal és alacsony molekulásúlyú kelátképzőkkel alakít ki. A gyöktermelődés szempontjából fontos még a kelátokban kötött és az olyan komplexekben található vas, mint az ATP, GTP vagy a szerves savak, amelyek a DNS-hez vagy a membránlipidekhez kötődnek. Ezek képesek részt venni a Fenton-reakcióban:



A $\bullet\text{OH}$ az egyik legreaktívabb ismert gyök, szinte minden molekulával reakcióba lép. A gyök reakciói három nagy csoportba oszthatók: (i) a hidrogénatom eliminálása, (ii) a kettős kötések és aromatikusan gyűrűk kialakítása és (iii) az elektrontranszfer. Mindhárom esetben érvényesül a gyökök kémiai természete, miszerint egy nem gyök természetű anyag reakciója egy gyökkel mindig gyök termelődését idézi elő, amely lehet alacsonyabb vagy magasabb reaktivitású. A láncreakció addig folytatódik, míg egy stabil végállapotú molekula alakul ki. A $\bullet\text{OH}$ ilyen láncreakció előidézésével okoz lipid-peroxidációt, DNS-léziókat és fehérje-oxidációt.

A $\text{O}_2^{\bullet-}$ -val és a H_2O_2 -val ellentétben a $\bullet\text{OH}$ -kel szemben nem alakult ki enzimatis védelem, ezért a leghatékonyabb védelem ellene a termelődésének megakadályozása a vas-anyagcsere szigorú kontrollálásán keresztül. A sejtalkotók környezetében mindig találhatóak olyan antioxidáns tulajdonságú molekulák, amelyek hajlamosak reakcióba lépni a különböző ROS-okkal, ezáltal közömbösítve őket, és megállítva a gyökös láncreakciókat. Ezek a molekulák az antioxidánsok (Gille és Sigler, 1995; Halliwell és Gutteridge, 2007).

III.1.2. Antioxidáns enzimek és nem enzimatis molekulák

Antioxidáns minden olyan molekula, amely képes stabilizálni vagy inaktiválni a szabadgyököket és nem gyökös reaktív formákat (pl. H_2O_2). Léteznek enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok, amelyek szinergizmusban működnek a sejtek védelmében.

Az egyik leghatékonyabb intracelluláris enzimatis antioxidáns a **szuperoxid-dizmutáz** (SOD), amely a szuperoxid-aniont oxigénné és hidrogén-peroxiddá alakítja át:



A szuperoxid-dizmutáznak több izoformája van, amelyeket az aktív fém centrum természete alapján különböztetünk meg. A CuZnSOD az eukarióták citoszóljában található meg, valamint a kloroplasztisban és néhány prokariótában; a MnSOD a prokariótákban illetve a mitokondriumban található, míg FeSOD-ot főleg prokarióták, algák és néhány növény kloroplasztisza tartalmazza. A SOD a $\text{O}_2^{\bullet-}$ -t egymást követő oxidatív és redukzív ciklusokon keresztül semlegesíti (*1. ábra*) (Scandalios, 2005; Rahman, 2007).

S. pombe-ben a *sod1*⁺ gén kódolja a CuZnSOD-ot, amely a fő SOD-nak tekinthető a hasadó élesztőben, hiszen a korai exponenciális fázisban a SOD készlet 80%-át adja, ez az arány azonban a stacioner fázisban 10%-ra csökken. A *S. pombe* sejtosztódása során folyamatosan redukált állapotú citoplazmát igényel, amelynek fenntartásához - a glutation

és a glutation-reduktáz mellett - elengedhetetlenül szükséges a CuZnSOD is. A *sod1Δ* sejtek nem életképesek, azonban a *sod1⁺* génexpressziójának elnyomására válaszként az S fázis után, a G2 fázis és a citokinézis között leáll a sejtciklus. A *sod1⁺* gén aktivációjában részt vesznek a Pap1 és Prr1 transzkripciós faktorok, az Atf1 érintettsége azonban vitatott (Lee és mtsai., 2002; Mutoh és mtsai., 2002). *S. pombe*-ben a *sod2⁺* gén kódolja a mitokondriális MnSOD-ot. A génkifejeződésért a Wis1-Sty1 MAPK útvonal a felelős, azonban az *atf1* és a *pap1* gén mutációja nem befolyásolta azt, tehát ezen a transzkripciós faktoroktól független a *sod2⁺* gén indukciója, amelyet az is bizonyít, hogy a gén promótere nem tartalmaz sem Atf1 és Pap1 transzkripciós faktor kötő helyet (Jeong és mtsai., 2001).

A kialakult H₂O₂-t a **kataláz** (CAT) semlegesíti. A CAT egy tetramerikus hem-tartalmú enzim, amely megtalálható az aerob sejtek peroxiszómájában. Nagyon hatékony a H₂O₂ vízzé és molekuláris oxigénné bontásában, ugyanis egy CAT molekula kb. 6 millió H₂O₂-molekulát képes átalakítani percenként egy katalitikus reakcióban, ahol a H₂O₂ a hidrogén-molekulák akceptoraként és donoraként egyaránt szerepel:



Éppen ezért a CAT nagyon energia-hatékonyan működik, mert anélkül bontja a H₂O₂-ot, hogy a sejt redukciós kapacitását fogyasztaná (*1. ábra*). A finom egyensúly a CAT és a SOD-ok között különösen fontos a sejtek számára. Ha a H₂O₂-ot semlegesítő CAT hiányzik, a káros •OH SOD-katalizált termelődése túlsúlyba kerülhet. Ez magyarázhatja azokat a sejtkárosodásokat, ahol extrém magas SOD-szintet mértek (Gille és Sigler, 1995; Scandalios, 2005; Rahman, 2007).

Az *S. cerevisiae*-vel ellentétben a *S. pombe*-ben egyetlen gén, a *ctt1⁺* kódolja a CAT-t. A gén hiányában a deléciós mutánsok extrém érzékenységet mutattak a H₂O₂-dal szemben, míg a túltermelő törzsek rezisztensek voltak a kezelésre, ezzel bizonyítva, hogy a hasadó élesztőben CAT felelős elsősorban a H₂O₂ elleni védekezésért. CAT-aktivitás mutatható ki a citoszólban és a sejtorganellumokban (elsősorban a peroxiszómákban) is, azonban mind a kettő, molekulásúly alapján elkülöníthető forma egyetlen gén terméke, ugyanis a *ctt1⁺* gén hiányában egyik frakcióból sem volt kimutatható a CAT (Lee és mtsai., 2000).

A H₂O₂ eltávolításában szerepet játszik egy másik enzimesalád, a **glutation-peroxidázok** (GPx) is. H₂O₂-t és egyéb szerves peroxidokat (pl. *t-butil*-hidroperoxid, foszfolipid-hidroperoxid) alakítanak át vízzé vagy alkohollá, miközben oxidálják a glutationt, és működésükhöz nincs szükségük katalitikus fémionokra (*1. ábra*) (Halliwell

és Gutteridge, 2007). Ellentétben az emlősök vagy a *S. cerevisiae* GPx-ével, a *S. pombe* GPx nem tartalmaz szelént vagy szelenociszteint az aktív centrumában, helyette szabad cisztein található (Penninckx, 2002).

A *S. pombe*ban egyetlen gén, a *gpx1*⁺ kódolja a GPx-t. Normál esetben, stressz nélkül a gén expressziója a stacioner fázisban emelkedik meg, így hozzájárul a sejtek hosszú távú életben maradásához. (Lee és mtsai., 2008). A GPx mind a citoszólban, mind a mitokondriumban megtalálható. A hasadó élesztőben egyetlen izoformája létezik, ellentétben a *S. cerevisiae*vel, ahol három GPx különböztethető meg (Lee és mtsai., 2008). Termelődése különböző stresszekre (oxidatív-, ozmotikus-, hőstressz) indukálódik, amely az Atf1 transzkripciós faktor kontrollja alatt áll, azonban a *pap1* gén hiánya nem befolyásolja a kifejeződését (Yamada és mtsai., 1999).

Az oxidált glutationt a **glutation-reduktáz** (GR) alakítja vissza GSH-vá (1. ábra). A GR két alegységet tartalmaz, mindegyikben egy FAD-dal az aktív helyén. A NADPH redukálja a FAD-ot, amely továbbadja az elektronjait az aktív hely diszulfid-hídjára. Az így kialakult két SH-csoport interakcióba lép a GSSG-vel és redukálja két GSH-ra.

A *S. pombe*ban a GR-t kódoló *pgr1*⁺ gént számos oxidáns, a hősokk, a magas ozmolaritás és az éhezés is indukálhatja. Ezekre a különböző külső stresszekre adott génexpresszió-változás elsődlegesen a Pap1 transzkripciós faktoron keresztül közvetítődik. A géntől 5' irányban azonban egy Atf1-kötő szekvencia is megtalálható, így feltételezhető, hogy különböző ingerekre válaszolva az Atf1 transzkripciós faktor is befolyásolja a *pgr1*⁺ gén aktivitását (Lee és mtsai., 1997).

A GR nélkülözhetetlen a sejtosztódáshoz, hiányában illetve kiürülésekor a sejtciklus leblokkol a G1 fázisban. A blokk oka a ribonukleotid-reduktáz aktivitásának csökkenése, amely elektron-donorként GSH-t igényelne a működéséhez. A blokk emellett összefüggésben van a mitokondrium diszfunkciójával is. A mitokondriumban nem termelődik *de novo* GSH, ezért a citoszólból kell felvennie energiaigényes folyamattal, a belső membránon keresztül, anion-karriersek segítségével. A légzés során a mitokondriumban keletkező nagy mennyiségű ROS semlegesítése sok GSH-t igényel, amely a folyamat során GSSG-vé alakul át. Mivel a GSSG nem exportálódik vissza a citoszólba amíg nem redukálódott vissza GSH-vá, a mitokondriumban belül nagy mennyiségű GR-re van szükség. Éppen ezért, ha a GR mennyisége lecsökken, a légzésben is drasztikus csökkenés figyelhető meg (Song és mtsai., 2006).

Míg izoláltak olyan mutánsokat, amelyek csökkent mennyiségű GSH mellett is életképesek, addig a sejtek normális osztódásához elengedhetetlen a folyamatos, megfelelő

GR aktivitás a GSSG felhalmozódásának elkerülésére, amely magas reaktivitást mutat a szabad szulfhidril-csoportokkal, épp ezért igen toxikus. A GR sejtnevelésben betöltött nélkülözhetetlen szerepe egyedülálló jelenség, amely arra utal, hogy a GSSG-t eltávolító különböző alternatív útvonalak (pl. tioredoxin, lipamid dehidrogenáz) nem működnek elég hatékonyan a *S. pombe*-ben, ellentétben az *Escherichia coli*-val vagy a *S. cerevisiae*-vel (Lee és mtsai., 1997).

A GSSG vissza-redukálásához szükséges NADPH-t főként a pentóz-foszfát ciklus során állítják elő a sejtek, amelyben a **glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz** (G6PD) van kulcsszerepe.

A védekezés egy másik formáját végzi a **glutathion S-transferáz** (GST) enzim, amely a különböző cito-és genotoxikus xenobiotikumokat konjugáltatja a GSH-hoz a detoxifikálás első lépéseként (*I. ábra*). A keletkezett konjugátum vízoldékonyabb lesz, így könnyebben választódik ki a sejtekből, és membránhoz kötött glutathion-konjugált pumpák, transzporterek vagy vakuólumok segítségével kiáramlik a sejtéből (Cho és mtsai., 2002; Veal és mtsai., 2002; Halliwell és Gutteridge, 2007).

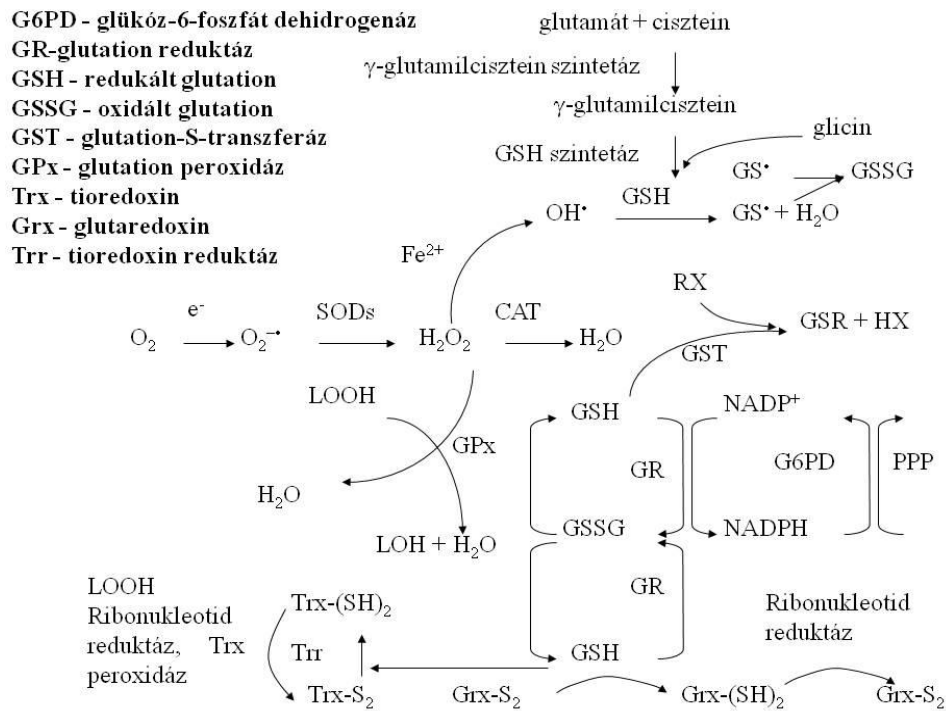
Három gén, a *gst1*⁺, *gst2*⁺ és *gst3*⁺ kódol különböző GST-eket a *S. pombe*-ben. A *gst1*⁺ és *gst2*⁺ hasonló, 79%-ban megegyező fehérjét kódol, azonban a Gst3 fehérje csak 14%-ban hasonlít az előző kettőre. Mindhárom fehérjének van GST-aktivitása, azonban a Gst3 peroxidáz-aktivitással is rendelkezik, tehát képes szerves peroxidokat is eltávolítani a sejtéből. A Gst1 és a Gst2 is képes homodimerek kialakítására, illetve egymással heterodimert is alkothatnak, azonban a Gst3 nem képez komplexet egyikkel sem, csak homodimereket hoz létre. A GST1 és 2 eloszlik a sejtben, a GST3 azonban a sejt-magban lokalizálódik. A stresszre válaszolva mindhárom gén expresszióját Sty1 MAP kináz szabályozza. A szabályzásban a *gst1*⁺ és *gst2*⁺ esetén a Pap1 transzkripció faktor is rész vesz, a *gst3*⁺ expressziójához azonban az Atf1 transzkripció faktorra van szükség. Ez alapján elmondható, hogy különböző erősségű H₂O₂ stresszre válaszolva más GST-k termelődése növekszik meg. Mindhárom GST-re szükség van az antifungális anyagok (pl. fluconazol) detoxifikálásához. Ezek az ismeretek arra engednek következtetni, hogy a GST-eknek különböző és egymással átfedő szerepük is van az oxidatív stressz és a xenobiotikumok elleni védekezésben (Veal és mtsai., 2002).

A legjelentősebb nem enzimatis antioxidáns a **glutathion** (L- γ -glutamil-L-cisztein-glicin, GSH), amely egy tripeptid molekula, ciszteinjén egy SH-csoporttal. A GSH egy multifunkcionális intracelluláris antioxidáns, amely megtalálható a citoszólban, a

sejtmagban és a mitokondriumban, akár mM-os koncentrációban is. A GSH oxidált formája a glutation diszulfid (GSSG). A GSSG két glutationil-gyök összekapcsolódásából is létrejöhet (1. ábra). A GSH fő oxidatív stressz elleni védő hatása abból adódik, hogy képes több detoxifikáló enzim kofaktoraként is működni, fontos elektrononora számos olyan enzimnek, amelyeknek a katalitikus centrumában redukciós lépés zajlik (pl. GPx), emellett részt vesz a plazmamembránon keresztüli aminosav transzportban, és visszaalakítja a C- és E-vitamint aktív formájukba. Képes *in vivo* direkt reagálni számos gyökkel, köztük a HO•, hipoklórossav (HOCl), peroxinitrit (ONOO⁻), nitrogén-dioxid (NO₂•) gyökökkel és a szinglett oxigénnel, azonban a szuperoxid gyökkel nem, vagy csak nagyon lassan. A tiolcsoport antioxidáns kapacitását a kénatomtól kapja, amely könnyedén alkalmazkodik egy elektron elvesztéséhez. Az oxidált glutation a sejten belül felhalmozódhat, a GSH/GSSG arány jó mutatója a sejt oxidatív stresszállapotának. A sejten jelentős mennyiségben felhalmozódott GSSG képes számos enzimet inaktiválni, mert vegyes diszulfidok alakulnak ki pl. az adenilát-cikláz enzimhez kapcsolódva (Gille és Sigler, 1995; Halliwell és Gutteridge, 2007; Rahman, 2007).

A GSH a citoszólban képződik két, ATP-t igénylő enzimatikus lépésben: első lépésben az L-ciszteinből és L-glutamátból kialakul a γ -glutamilcisztein, amely lépést a γ -glutamilcisztein-szintáz (GCS) katalizálja. Második lépésben a γ -glutamilciszteinből és a glicinből alakul ki a GSH a glutation-szintetáz (GS) segítségével. A GCS enzim negatív visszacsatolással szabályozza a GSH előállítását, így ha az elérhető GSH és L-glutamát mennyisége magas, leállítja a szintézist (Kim és mtsai., 2004a). A *S. pombe* GCS gén működését számos tényező befolyásolja, többek között a nehézfémek, O₂^{-•}, a NO, GSH-fogyasztó anyagok (pl. butionin-szulfiximin, dietilmaleát) és a különböző szénforrások elérhetősége. Válaszolva az oxidatív és nitrozatív stresszre, megemelkedik a GCS gén expressziója. A *S. pombe* GCS gén upstream régiójában 4 Pap1 kötőhely található, amely stressz hatására szabályozza a gén kifejeződését. A GCS gén kifejeződésének kismértékű szabályozása jelentős változást okozhat a GSH mennyiségében, mivel a GCS gén szabályozza a GSH szintézisét (Kim és mtsai., 2004a). A *S. pombe* GS génje szintén a Pap1 transzkripciós faktor szabályzásán keresztül indukálódik oxidatív-, nitrozatív-, valamint éhezés-stressz hatására (Kim és mtsai, 2004b).

Az endogén bioszintézis mellett az élesztők speciális plazmamembrán-transzportereken keresztül képesek felvenni a GSH-t az extracelluláris környezetükből is (Penninckx, 2002).



1. ábra. A ROS-ok semlegesítése és a GSH oxido-redukciós rendszer (Pócsi és mtsai., 2004 alapján).

III.2. A *Schizosaccharomyces pombe*

A *S. pombe*-t 1893-ban izolálta Lindner a kelet-afrikai köles sörből. Az alap kutatások, a molekuláris biológia, genetika és sejtbiológia egy jól jellemezett modellorganizmusa. Az 1970-es évek során sok módszert dolgoztak ki a *S. pombe* törzseinek fenntartására, vegetatív növekedésének, genetikai kereszteződéseinek vizsgálatára és a mutánsok izolálására.

Sejtjei henger alakúak, 7-14 μm hosszúak és 3-4 μm szélesek (Sunnerhagen, 2002). Genomja a hatodik, teljes egészében megszekvenált eukarióta genom (Wood és mtsai., 2002). Elérhető 4836 heterozigóta diploid deléciós mutánsa, amely a teljes genomjának 98,4%-át lefedi, valamint 3308 haploid deléciós mutánsa, amely 92,8%-os lefedettséget biztosít. A deléciós mutánsok ideális modelljei a különböző kemikáliák (toxinek, antibiotikumok) célpontjait, a génfunkciókat, valamint molekuláris biológiai folyamatokat és útvonalakat célzó vizsgálatoknak (Kim és mtsai. 2010). *S. pombe* plazmidok segítségével lehetővé válik egyes gének funkciójának vizsgálata, összehasonlítva az adott génben mutáns törzssel, illetve bizonyos géntermékek expressziójának emelése. Különböző gének plazmidon történő bevitelével elérhető a heterológ génexpresszió, amely által emlős fehérjék (pl. rekombináns alegység vakcinák), élelmiszeriparban fontos

enzimek (pl. kimozin, glükóamiláz) termeltethetőek meg a *S. pombe*ban (Giga-Hama és Kumagai, 1997).

III.2.1. A *S. pombe* rendszertani besorolása

A hasadó élesztőként is ismert *S. pombe* az *Eumycoták* alországába, *Ascomycota* tagozatba, *Archiascomyces* osztályba, *Schizosaccharomycetales* rendbe, *Schizosaccharomycetaceae* családba sorolható (Sipiczki 1989; Kurtzman és mtsai., 2011).

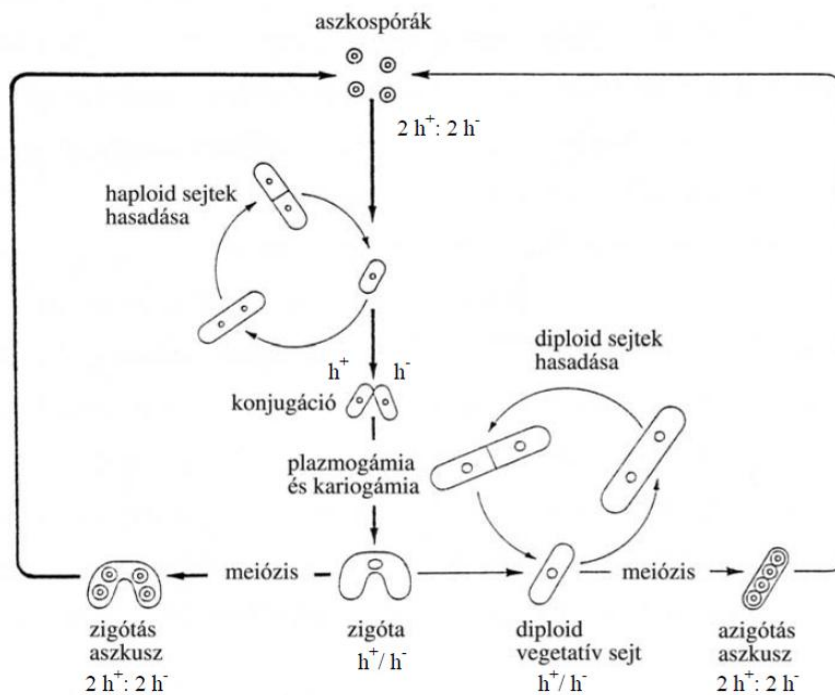
III.2.2. A *S. pombe* genetikája

A hasadó élesztők fejlődése megközelítőleg 330-420 millió évvel ezelőtt ágazott el a sarjadzó élesztőkéttől. Genomja 13,8 Mb méretű, amely három kromoszóma között oszlik meg; az I. kromoszóma 5,7 Mb, a II. kromoszóma 4,6 Mb, a III. kromoszóma 3,5 Mb, valamint mitokondriális genomja 20 kb nagyságú (Wood és mtsai., 2002). A kromoszóma-szerkezete hasonló a többsejtű eukariótákéhoz. Bár nem található meg a nagyon extenzív heterokromatin, mint a multicelluláris organizmusoknál, van három heterokromatikus régiója, a centromerek, a telomerek és a mating type régió (Sunnerhagen, 2002). A replikációs origók nagyméretűek és komplexek (Sabatinos és Forsburg, 2010). A *S. pombe* genom 4940 fehérje-kódoló génnel rendelkezik. 51 gén mutat szignifikáns hasonlóságot humán betegséget hordozó génekkel, melyek fele daganatos megbetegedésekkel hozható összefüggésbe. A hasadó élesztőben megtalálhatóak erősen konzervált gének is, amelyek fontosak az eukarióta sejt szerveződésében - beleértve a citoskeleton, a kompartmentalizációt, a sejtciklus-kontrollt, a proteolízist, a fehérje-foszforilációt és az RNS-splicingot (Wood és mtsai., 2002). A *S. pombe* nagy genetikai előnye monolitikus háttere, mert az általános laboratóriumi gyakorlatban használt törzsek izogenikusak az eredeti izolátummal. Ez a *S. cerevisiae*-ről viszont nem mondható el (Sunnerhagen, 2002).

III.2.3. A *S. pombe* életciklusa

Az *S. pombe* életciklusa túlnyomórészt haploid, és csak nitrogén-éheztes hatására képez diploidokat, illetve diploid fázisa normál körülmények között magára a zigótára korlátozódik, amely egyenesen a meiózisba lép közbeeső mitózis nélkül. Vegetatív módon mediális hasadási osztódással szaporodnak. Ivaros szaporodásuk konjugációval, majd askospórák képzésével történik. A haploid sejtek lehetnek heterotallikusak (párosodási típus: h^+ és h^-) és homotallikusak (h^0). Az eltérő sejtek feromonok termelésével kölcsönösen ivarsejtekké alakítják egymást. Az eltérő párosodási típusú sejtek konjugálnak, ezzel dikarionos sejtek alakulnak ki, amelyekből diploid zigóta lesz. A zigóta

mitózissal diploid vegetatív sejtekké alakul. A sejtek jó tápanyag-ellátottság mellett tovább szaporodnak. Nitrogénszegény környezetben a sejtek meiózissal aszkusszá alakulnak, 4 haploid meiospóra jön létre, melyekből csírázással újra haploid vegetatív sejtek képződnek. A diploidok által előállított azigotikus aszkuszok kicsik és lineárisak, míg a meiózis után létrejövő zigotikus aszkuszok banán vagy cikk-cakk alakúak (2. ábra) (Sunnerhagen 2002; Sabatinos és Forsburg, 2010).



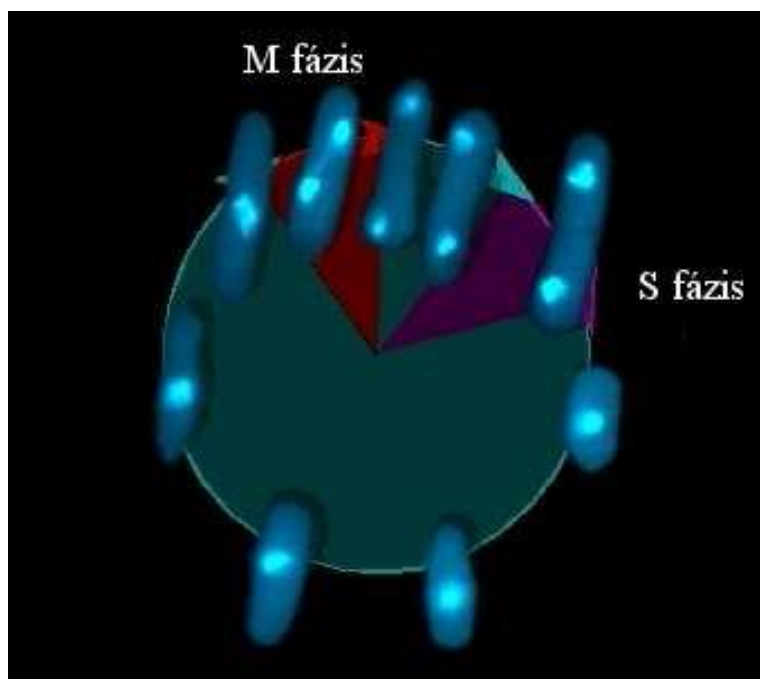
2. ábra. A *S. pombe* életciklusa (Gutz, 1974).

III.2.4. A *S. pombe* sejtciklusa

A *S. pombe* sejtosztódási ciklusa és annak szabályozása sokkal jobban hasonlít a legtöbb más eukarióta sejtosztódásához, viszont jelentősen eltér a sarjadzó élesztő osztódásától, épp ezért keltette fel a sejtbiológusok figyelmét (Sunnerhagen, 2002). A sejtciklus különálló átkötő G1 (10%), a DNS replikációt szolgáló S (10%), a szintén átkötő G2 (70%) és mitózis M (10%) fázisára osztható. A hasadó élesztők szimmetrikusan osztódnak, az osztódási szeptum az anyasejt közepén helyezkedik el, így az anyasejt és az utódsejt mérete megegyezik. A G1 fázis rövid, mert a sejtek hamar elérik a G1/S fázisátmenethez szükséges méretet. A G1, S és M fázis rövid, összesen a sejtciklus 30%-át teszi ki. A ciklus többi része a G2 fázisból áll, melyben növekszik a sejt, hogy elérje a mitózisba lépéshez szükséges sejt méretet (Mosser és Russel, 2000, Sabatinos és Forsburg, 2010).

A sejtmag osztódásának ciklusa a sejt osztódásához viszonyítva lépcsőzetesen elosztott. Az újonnan osztódott mag a következő sejtciklusba lép, és végigmegy a G1 és S

fázison még a citokinézist megelőzően. Így az újonnan létrejött sejt már a G2 fázisban van (Sabatinos és Forsburg, 2010). Az interfázisban lévő - nem mitotikus - sejtek nagy sejtmaggal rendelkeznek, amelyben sötét foltként jól látható a kisebb méretű magvacska (3. ábra). A mitotikus sejtek kondenzált sejtmagja átmegy a metafázison, anafázison, telofázison, majd a kromoszómákat a mitotikus orsó választja el egymástól. A szeptum az S fázisba lépéskor alakul ki (1. webhely).

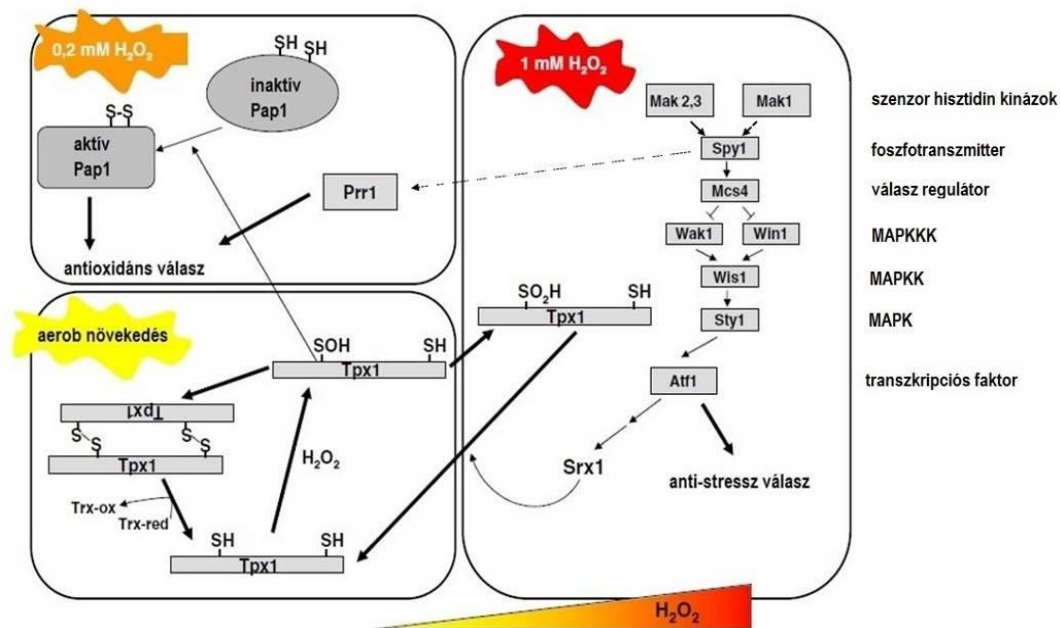


3. ábra. A sejtmagok a sejtciklus különböző fázisaiban (<http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/main2.html>).

Azért nagyon hasonló a *S. pombe* sejtosztódása a legtöbb multicelluláris eukariótáéhoz, mert a kromoszóma kondenzációja egy meghatározott ponton, a G2/M fázishatáron kezdődik. A sejtciklus és checkpoint szabályzása szintén fontos modellorganizmussá teszi a hasadó élesztőt. Erre példa a Cdc2, vagyis a hasadó élesztő Cdk szabályzása, a Tyr15 foszforilációjának gátlása a Wee1 fehérje kinázon keresztül, amely a mitózisba lépés központi mechanizmusa. Ez az egyik fő kontroll-folyamat, amely a legtöbb eukariótában mitotikus sejtosztódás során megfigyelhető (Sunnerhagen, 2002).

III.2.5. A *S. pombe* oxidatív stresszre adott válaszána szabályzása

Az élesztőkben három fő jelátviteli modul található, amely az oxidatív stresszre adott transzkripcionális szabályzást irányítja: (1) a MAPK (mitogén-aktivált protein-kináz) kaszkád, (2) a többlépcsős foszforelé-rendszer és az (3) AP-1 (Activating Protein 1)-szerű transzkripció faktor (4. ábra) (Ikner és Shiozaki, 2005).



4. ábra. A különböző mértékű oxidatív stresszre adott válaszok szabályozása a háromféle útvonalon keresztül a *S. pombe*-ben. A szaggatott nyilak a foszforelé-rendszer feltételezett szignál-transzdukcióját jelölik (Ikner és Shiozaki, 2005 és Vivacos és mtsai., 2006 alapján).

Stressz hiányában a *S. pombe*-ben nem esszenciális a MAPK-kaszád, de különféle extracelluláris stresszekkel (pl. ozmotikus-, hő- és hidegstressz, magas H_2O_2 koncentráció, glükóz- vagy nitrogénéheztetés, toxikus kationok és nehézfémek) szemben a Sty1 útvonal közvetít választ, és szükséges a sejtek túléléséhez, védekező mechanizmusok komplex transzkripcionális programját indítja el. A MAP-kináz modul több elemből áll, ezek a MAP-kináz Sty1, a MAPK-kináz Wis1, amely a Sty1 treonin és tirozin aminosavait foszforilálja, és a MAPKK-kináz Wak1 és Win1, amelyek egymást helyettesítően funkcionálnak, és az egyetlen szubsztrátjuk a Wis1. Ezek a kinázok különböző stressztípusokra válaszolva kaszkádszerűen foszforilálják egymást. Az aktiváció a specifikus szerin/treonin-kináz kettős foszforilálásával történik. A Sty1-et aktiváló stressz következtében foszforilálódik az Atf1 transzkripciós faktor, amely a sejtmagban lokalizálódik és a stresszválaszban szerepet játszó gének transzkripcióját aktiválja, pl. az antioxidáns védelmi mechanizmus részeként a CAT-t (*ctt1*⁺), GPx-t (*gpx1*⁺), szulfiredoxint (*srx1*⁺), a GST-t (*gst1*⁺, *gst2*⁺, *gst3*⁺) kódoló génekét (Ikner és Shiozaki, 2005; Vivacos és mtsai., 2006). Az Atf1 transzkripciós faktor Sty1 általi foszforilációja specifikus jelenség, ugyanis a Sty1 nem képes foszforilálni a jelátvitelben szintén fontos szerepet játszó másik transzkripciós faktort, a Pap1-et (Wilkinson és mtsai., 1996). A MAPK-kaszád Sty1 elemével áll kölcsönhatásban a Sin1 fehérje, amely esszenciális eleme olyan

folyamatoknak, amelyek a sejtciklus megfelelő előrehaladását segítik a G1/S és G2/M fázisátlépések alatt (Ikeda és mtsai., 2008).

A *S. pombe* MAPK-kaszkája elé kapcsolódva található egy ún. többlépcsős foszforelé-szignalizációs modul, amely a bakteriális két-komponens rendszer egy variációja és érdekes kapcsolatot jelent a pro- és eukarióta szignalizációs modulok között. A *S. pombe*ban három szenzor-kináz gén található, a *mak1*⁺, *mak2*⁺ és *mak3*⁺. A szenzor-kináz a doménjén belül foszforilál egy hisztidint, amely jel tovább adódik a válaszregulátor fehérjére, amelyet a *spy1*⁺ gén kódol, míg az *mcs4*⁺ gén terméke foszfortranszferként működik. A hasadó élesztőben a Mak2,3-Spy1-Mcs4 oxidatív stressz-szignálokat közvetít a Sty1 MAPK-kaszkádnak. A Mak1 egy másodlagos válasz regulátort, a Prr1-et szabályozza, amely transzkripció regulátorként működik, és az oxidatív stressz által kiváltott génexpressziót a Sty1-Atf1 útvonaltól függetlenül szabályozza (Ikner és Shiozaki, 2005).

Az AP-1 faktorok olyan transzkripció faktorok, amelyek oxidatív stressz-szenzorokként működnek, direkt szabályozzák a transzkripciót, és a legtöbb esetben függetlenek a MAPK- és a foszforelé-rendszerrel. Ez a *S. pombe*ban a Pap1 (**pombe AP-1**) transzkripció faktort jelenti. A Pap1 transzkripció faktor sokkal érzékenyebb a H₂O₂-ra, mint a MAPK Sty1 útvonal és adaptáció kiváltására alkalmas. A peroxiredoxin (Tpx1) a Pap1 útvonal redox szenzora, az útvonal első komponense, emellett gyökfogóként is működik. A H₂O₂ magas koncentrációja a Tpx1 szabad ciszteinjeit szulfinsavvá oxidálja, amely inaktíválja az útvonalat. A Tpx1 csak alacsony H₂O₂-stressz mellett képes a Pap1-re átadni a redox-szignált, ez adja a Pap1 útvonal koncentrációfüggő aktiválódásának az alapját (Ikner és Shiozaki, 2005; Vivacos és mtsai., 2006).

A Pap1 transzkripció faktor a citoplazmában található stressz-mentes körülmények között, oxidatív stressz hatására kerül be a sejtmagba. A Pap1 aktivációja olyan géneket indukál, amelyek az oxidatív stressz és multidrog-toxicitás elleni védekezésben játszanak fontos szerepet. Ilyen gének a CAT-t (*ctt1*⁺), tioredoxint (*trx2*⁺), tioredoxin-reduktázt (*trr1*⁺), GR-t (*pgr1*⁺) és az ABC-transzportereket (*hba2*⁺/*bfr1*⁺; *pmd1*⁺) kódoló gének. A H₂O₂-stressz intramolekuláris diszulfid-hidak kialakulását idézi elő a Pap1 központi és a karboxi-terminális szabad cisztein-klaszterei között, inaktíválva azt. Ezt az oxidációs állapotot a tioredoxin-rendszer tudja visszafordítani. A Sty1-függő transzkripcionális válasz részeként indukálódik az Srx1 expressziója, és ez a reduktáz újraaktiválja a túloxidált Tpx1-t. Ennek az inaktívációs mechanizmusnak a segítségével kerülhető el a Pap1 és a Sty1 oxidatív stresszválaszainak az átfedése (Vivacos és mtsai., 2006).

III.3. A mikotoxinok

A mikotoxinok kis molekulájú, természetes anyagok, amelyek fonalas gombák másodlagos anyagcsere-termékei. Ezek a metabolitok toxikológiailag és kémiaiilag olyan vegyületek, amelyek gerincesekben, gerinctelenekben, mikroorganizmusokban, és növényekben egyaránt betegségeket vagy halált okozhatnak (Benett és Klich, 2003).

A mikotoxinok a világon mindenhol előfordulnak. A világ terményeinek negyede szennyezett valamilyen mikotoxinnal. Az élelmiszertermelés, -feldolgozás, -tárolás és -forgalmazás szinte minden fázisában számolni kell jelenlétükkel. A penészgombák között vannak olyanok, amelyek toxinjaikkal már a szántóföldön szennyezik a növényeket (szántóföldi penészgombák), mások raktározás közben termelnek toxinokat (raktári penészgombák). Az előbbieket csoportjába tartoznak a *Fusarium* fajok, amelyeknek állat- és humán egészségügyi szempontból fontosabb toxinjai a zearalenon, a trichotecének, és a fumonizinek. A raktári penészgombák főbb képviselői az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok, amelyek aflatoxinokat, ochratoxin-A-t, citrinint, patulint, rubratoxin B-t, ergot-toxinokat termelnek (Zomborszky, 2004).

A toxintermelést számos környezeti tényező befolyásolja; ilyenek pl. a szubsztrát összetétele és minősége, a csapadék és a hőmérséklet. A mikotoxinok elterjedése az állati takarmányban földrajzi mintázatot mutat, pl. az *Aspergillus* fajok számára a trópusi és a szubtrópusi körülmények a megfelelőek, míg a *Fusarium* és *Penicillium* fajok a mérsékelt klímához alkalmazkodtak (Omar, 2013).

A mikotoxinok egészségkárosító hatásainak megértéséhez két fontos fogalmat kell tisztázni. Az első az **akut toxicitás**, amely egyszeri érintkezést/kezelést követően gyorsan kialakuló káros hatás. A második a **krónikus toxicitás**, amely többszöri, hosszú távú érintkezést/kezelést követően lassan, időben eltolódva kialakuló káros hatás. A mikotoxinok hatásait ezen két nagy csoport szerint érdemes vizsgálni (Omar, 2013).

III.3.1. A mikotoxinok és az oxidatív stressz

A mikotoxinokat három csoportba sorolhatjuk aszerint, hogy kiváltanak-e oxidatív stresszt, és ha igen, az mennyiben járul hozzá toxicitásukhoz. Az első csoportba tartoznak azok a mikotoxinok, amelyek toxicitása elsősorban oxidatív stressz-generáló képességükben rejlik, és amely toxicitás teljesen megszűnik antioxidánsok jelenlétében. Ilyen például a zearalenon, a citrinin és a patulin. A második csoportba azok a mikotoxinok sorolhatóak, amelyek antioxidánsok jelenlétében is toxikusak maradnak, jelezve, hogy az oxidatív stressz részben hozzájárul toxicitásukhoz, ám nem ez annak egyetlen oka (pl.

aflatoxinok, T2 toxin, fumonizinek). A harmadik csoportba olyan mikotoxinok tartoznak, mint például a deoxinivalenol és az ochratoxin-A (OTA), amelyek úgy okoznak patológiás elváltozásokat, hogy ebben nem játszik szerepet az oxidatív stressz. Ezek a toxinok az oxidatív stressztől függetlenül indukálnak sejthalált, direkt genotoxikus hatásuk miatt (Golli-Bennour és Bacha, 2011). Más, az OTA hatásait összefoglaló művekben viszont számos kutatást említenek, amelyekben kimutatták, hogy az OTA ROS-képződést, lipid-peroxidációt és oxidatív DNS-károsodásokat okoz, amely káros hatások egyrészt antioxidánsokkal csökkenthetőek – bizonyítva oxidatív stressz-generáló hatását – másrészt jelentősen hozzájárulnak a toxin karcinogén hatásához (Martin-Kuan és mtsai., 2011).

Az oxidatív stresszt indukáló mikotoxinok toxicitásának fő oka a ROS-ok termelődése és az általuk előidézett sejtkárosítás, melyben főként olyan makromolekulák szenvednek elváltozásokat, mint pl. a membránlipidek többszörösen telítetlen zsírsavai, a fehérjék, a DNS és a membránhoz kötött enzimek. Az enzimek és nem enzimikus fehérjék sérülésével csökkenhet a sejt antioxidáns védekező rendszerének hatékonysága, így az oxidatív károsodás mértéke még magasabb lehet. Emellett a mikotoxinok által indukált nagymértékű lipid-peroxidáció is fontos a citotoxikus hatás kialakításában (Omar, 2013). A mikotoxinok szerkezete és hatásmechanizmusa igen eltérő lehet, így oxidatív stresszt is több útvonalon keresztül válthatnak ki, pl. a megváltozott membrán-permeabilitás következtében változik az intracelluláris jelátviteli útvonalak működése, amely oxidatív stresszhez vezet. A xenobiotikus bioaktiváció azáltal vezethet oxidatív stresszhez, hogy bizonyos enzimek (pl. prosztaglandin-H-szintáz, lipoxigenázok, citokróm P450) olyan szabadgyök-intermediereké oxidálják a toxinokat, hogy azok közvetlenül vagy indirekt módon képesek az oxigénnel, ROS-okat eredményezve (CAST, 2003; Omar, 2013).

A mikotoxinok által előidézett oxidatív károsodás többféleképpen is kimutatható; mérhető a malondialdehid felhalmozódásával, amely lipid-peroxidációt jelez, kimutathatóak a különböző termelődött ROS-ok, az egyszálú DNS törései és a DNS-adduktok felszaporodása, amelyek mind a mikotoxinok prooxidáns hatásával hozhatóak összefüggésbe. Emellett a GSH mennyiségi változásain és a különböző antioxidáns enzimek aktivitásának mérésén keresztül is vizsgálható a mikotoxinok oxidatív stressz-generáló hatása (Surai és mtsai., 2008).

Az oxidatív stresszre válaszul termelődni kezdenek a hő sokk-proteinek (Hsp), az ún. dajkafehérjék is, amelyek elősegítik a fehérjék megfelelő konformációjának felvételét, megelőzik a fehérjék aggregációját vagy kijelölik a helytelen konformációt felvett fehérjék

specifikus degradációs útvonalát, ezáltal kulcsszerepet játszanak a sejt védelmében és a javító mechanizmusokban (Golli-Bennour és Bacha, 2011). A Hsp-k az oxidatív stressz korai markereinek tekinthetők, mert kémiai és/vagy oxidatív stresszorok hatására megjelennek, még ha nem is alakul ki károsodás (Hassen és mtsai., 2007). Az eukarióta sejtekben a Hsp70 érzékeli az oxidatív stresszt azáltal, hogy redox-szenzorként működik (Golli-Bennour és Bacha, 2011). A Hsp-k megjelenése azonban nem specifikus a mikotoxinok okozta stressz során, de az oxidatív védekező rendszer fontos válaszáának tekinthetőek, jól alkalmazhatóak a mikotoxinok okozta oxidatív károsodás biomarkereként (Golli-Bennour és Bacha 2011).

III.3.2. A zearalenon

III.3.2.1. Történeti áttekintés

Európa, Ázsia és Amerika mérsékelt övi régióinak egyik leggyakoribb, *Fusarium* fajok által termelt mikotoxinja a zearalenon (ZEA), melyet a penészgombák magas páratartalom és alacsony hőmérséklet mellett termelnek legjobban (Yazar és Omurtag, 2008). A ZEA nevét a *Zea mays*, rezorcilsav lakton (resorcyclic acid lactone), a C-1' és C-2' közti kettős kötés (-ene), és a C-6' keton (-one) kombinációból kapta. A ZEA-val szinte egy időben egy másik, *Fusarium graminearum* által termelt toxint is izoláltak és kristályosítottak, amelyet F-2-nek neveztek. A korai irodalom nagy része szinonimaként használja a zearalenont és az F-2-t, azonban mára a két vegyületet külön toxinként ismerik (Bennett és Klich, 2003).

A ZEA erősen toxikus. Bár nem rendelkezik szteroid-struktúrával, ezzel analóg a szerkezete, hasonlít a 17- β -ösztradiolra, amely a petefészek által termelt legfontosabb hormon, és ezen hasonlóság alapján köt az emlős célsejtek ösztrogén receptorához. (Bennett és Klich, 2003; Fink-Gremmels és Malenkinejad, 2007). Hatását főként a reprodukciós képesség befolyásolásával fejti ki, hiperösztrogenizmust idéz elő, amelynek fő tünetei az elhúzódó ösztrusz, anösztusz, meddőség, az emlőmirigyek megnagyobbodása, abnormális laktáció (Kuiper-Goodman és mtsai., 1987; Etienne és Dourmad, 1994; Heneweer és mtsai., 2007). A penészes magok elfogyasztása és a hiperösztrogenizmus közötti összefüggést már az 1920-as években megfigyelték. McNutt és mtsai. (1928) írták le először, hogy a penészes kukorica ösztrogenikus zavarokat okoz sertéseknél.

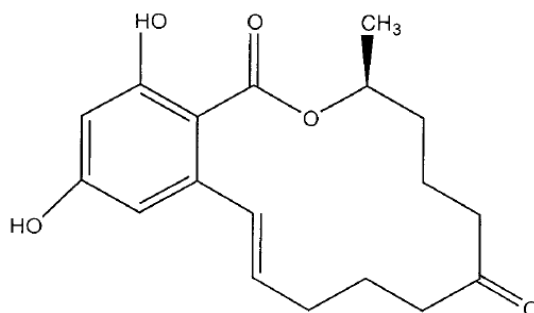
III.3.2.2. Termelő törzsek

A ZEA-t főleg a *Fusarium* genusba tartozó gombák pl. *F. graminearum* (*Gibberella zae*), *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* és a *F. semitectum* termelik, amelyek ismert talajlakó gombák a mérsékelt és meleg égövben, és világszerte a gabonafélék elterjedt szaprofita kórokozói (Zinedine és mtsai., 2007).

Az élelmiszerek és takarmányok általában egyszerre több mint egy toxinnal szennyezettek. A termelő *Fusarium* fajok a ZEA mellett más toxinokat (deoxinivalenolt, nivalenolt) is termelnek. Az előforduló toxinok koncentrációja eltérő lehet földrajzi régióként és a gazdanövényenként. Éppen ezért a takarmányokban és az élelmiszerekben különböző toxinok keverékei találhatóak meg (Fink-Gremmels és Malenkinejad, 2007).

III.3.2.3. A ZEA fizikai és kémiai tulajdonságai, előfordulása

A ZEA (5. ábra) (6-[10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenyl]- β -rezorcilsav lakton) kémiai neve 3,4,5,6,9,10-hexahidro-14,16-dihidroxi-3-metil-[S-[E]-1H-2-benzoxaciklo-tetradecin-1,7(8H)-dion. Összegképlete $C_{18}H_{22}O_5$, a molekula súlya 318,4 g/mol, vízben oldható, hőstabil, fehér, szagtalan, szilárd, kristályos anyag. Egy órán át 60 °C-on történő szárítás után az olvadáspontja 161-164 °C (Pohland és mtsai., 1982).



5. ábra. A ZEA szerkezeti képlete (Bennett és Klich, 2003).

Számos vizsgálat adatai alapján Európában a termények közül a kukorica szennyezett leggyakrabban és legnagyobb mértékben ZEA-val. A kukorica mellett a búza (*Triticum* spp.), a zab (*Avena sativa*), és alkalmanként a szójából (*Glycine max*) készült termékek is fertőzöttek lehetnek (Zinedine és mtsai., 2007).

A mikotoxinokat lehetetlen teljes mértékben eliminálni az élelmiszerekből és a takarmányokból. A kóros elváltozásokat még nem okozó mennyiségeket határértékekkel szabályozzák, hogy ezzel a közegészségügyi kockázatokat minimálisra csökkenthessék (Varga és mtsai., 2009). A legfontosabb élelmiszerek toxin-tartalmát és -fogyasztását figyelembe véve az átlagos napi beviteli értéket a World Health Organization (WHO) és a

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 0,5 µg/testtömeg kg-ban határozta meg (Zinedine és mtsai., 2007).

III.3.2.4. A ZEA hatása magasabbrendű eukarióta szervezetekre

A hormonális aktivitással rendelkező anyagok általában genotoxikusak és/vagy citotoxikusak. Több állatfajon is kimutatható a ZEA mindkét hatása mikoösztrógen tulajdonságának következtében. A ZEA legfontosabb hatásai az urogenitális rendszerhez köthetők. A leginkább veszélyeztetett állatok a sertések, de a szarvasmarhák és rágcsálók is érintettek. Változásokat okoz a reprodukzív rendszerben bizonyos laboratóriumi rágcsálóknál, mint az egér, a patkány, a tengerimalac, a hörcsög, a nyúl és különböző háziállatoknál is. Hosszú távú kitettség esetén toxicitásának krónikus hatásai révén hepatocelluláris adenomát és hipofízis-tumorokat indukál egerekben (Yazar és Omurtag, 2008).

Hím sertésekben csökkenti a tesztoszteron mennyiségét, a herék tömegét és a spermatogenezist, miközben feminizációt okoz. Szarvasmarhában csökkenti a tej mennyiségét, terméketlenséghez vezet. Rágcsálóknál többféle ösztrogenikus hatás (a csökkent termékenység, a progeszteron és ösztradiol megváltozott mértéke) is megfigyelhető, de egérre, patkányra, tengerimalacra és nyulakra nincs teratogén hatása (Zinedine és mtsai., 2007).

25 µg/g-nál magasabb koncentrációjú ZEA-t tartalmazó takarmánnyal etetett szarvasmarhák, juhok és sertések esetében a toxin és származékai bekerülhetnek az állatok tejébe. A baromfik, különösen a csirkék rezisztensek mondhatóak a toxinnal szemben. Esetükben a szennyezett takarmány elfogyasztása gyakran észrevétlen marad, mert nem okoz tüneteket (Kuiper-Goodman és mtsai., 1987).

III.3.2.5. A ZEA ösztrogén-specifikus sejtszintű hatása

Mivel a ZEA szerkezeti hasonlóságot mutat az 17-β-ösztradiol nemi hormonnal, a toxin és változatai képesek kompetitíven kötődni az ösztrogén receptorokhoz (Yazar és Omurtag, 2008). A toxin-receptor komplex a nukleuszba jut, ahol az ösztrogén-reszponzív elemekhez kötődik, ezzel befolyásolva a génexpressziót (Fink-Gremmels és Malenkinejad, 2007).

A ZEA és metabolitjai kiszorítják a hormont, és ösztrogenikus választ idéznek elő. Toxicitása összekapcsolódik a reprodukzív problémákkal az állatok és az ember esetében is. Ez a specifikus receptorokhoz történő kötődés megfigyelhető a méhben, az

emlőmirigyekben és a hipotalamuszban egyaránt (Yazar és Omurtag, 2008). Feltételezhetően a méhre a luteinizáló hormon és a progeszteron szekréciójának csökkentésével, valamint a szövetek morfológiájának megváltozásával hat (Zinedine és mtsai., 2007). A gyermeknél magzati korban a toxinnak való kitettség komoly következményekkel járhat, ilyen például a másodlagos nemi jellegek idő előtti megjelenése (Yazar és Omurtag, 2008).

Patkányokon végzett kísérletekben kimutatták, hogy ZEA-kezelés hatására megnövekszik a gyulladásért felelős gének expressziója, a gyulladás pedig aktiválja a különböző komplement-rendszerek elemeit és a kalcium-szignalizáció is megváltozik. Az epitheliális sejtekben a Ca^{2+} -nak kulcsszerepe van az oldott anyagok és a víz homeosztázisának fenntartásában a hormon-stimuláció után. A sejtmembrán víz-permeabilitásának szabályzóit az aquaporin-csatornák, amelyek a ZEA receptorhoz kötődését követően megnyílnak, vizet vesznek fel, amelynek következtében megfigyelhető a méh trofikus elváltozása (Heneweer és mtsai., 2007).

III.3.2.6. A ZEA nem ösztrogén-specifikus sejtszintű hatása

Minden állati sejt totipotens, a szervezet teljes genetikai állományát hordozza, ám nem expresszál minden gént. A ZEA nem ösztrogén-specifikus tulajdonságait olyan sejt típusokon vizsgálták, amelyek feltételezhetően (afrikai zöldmajom vese; Vero sejt vonal – Abid-Essefi és mtsai., 2004), vagy bizonyítottan (hepatocelluláris karcinoma; HepG2 sejt vonal – Gazzah és mtsai., 2010) nem expresszálják a β -ösztrogén receptort. Emellett a szintén gyakran használt humán epitheliális kolorektális adenokarcinóma (Caco-2) sejt vonal expresszálja ugyan a β -ösztrogén receptort, ám annyira alacsony mértékben, hogy a receptorok bizonyítottan nem reagálnak az ösztrogénre, nem adnak hormon-specifikus választ (Arai és mtsai., 2000).

Kouadio és mtsai. (2005) több mikotoxinnal (deoxinivalenol és fumonizin B1) összehasonlítva vizsgálták a ZEA általános, ösztrogén-specifikus tulajdonságaival nem összefüggő toxikus hatását Caco-2 sejteken. A három toxin közül a ZEA mutatkozott a legtoxikusabbnak, és csökkentette leginkább a sejtek életképességét. A ZEA koncentrációtól függően gátolja a sejtosztódást Caco-2 és Vero sejt vonalakon. Áramlási citometriás vizsgálatokkal kimutatható, hogy a toxin hatására lecsökken a G0/G1 fázisban lévő sejtek száma, amely csökkenés a G2/M fázisban kompenzálódik. Az ebben a fázisban található sejtek aránya tehát jelentősen megnövekedett, amely arra utal, hogy a DNS replikációjában hiba történt, ami miatt a sejt nem képes a mitózis fázisába lépni. A sejt

életképességének csökkenése arányos a G2/M fázisban ragadással, amely kiváltja a DNS- és a fehérje-szintézis gátlását (Abid-Essefi és mtsai., 2004). Részben a sejtosztódás gátlásán keresztül fejt ki immunotoxikus hatását azáltal, hogy gátolja a mitogén-aktivált limfocita osztódást. Emellett makrofág-aktivációt és különböző interleukinek (IL-2, IL-5) termelésének növekedését idézi elő (Yannikouris és mtsai., 2004; Zinedine és mtsai., 2007).

Genotoxikus, mert DNS-fragmentációt, kromoszóma-aberrációkat, mikronukleuszok kialakulását idéz elő (Abid-Essefi és mtsai., 2004). A ZEA kovalensen kötődik a DNS-hez, amely során a képződött adduktok javító mechanizmusok általi hasítása vezethet a mikronukleuszok kialakulásához. A toxin emellett a mitotikus orsó diszfunkcióját is okozhatja (Ouanes és mtsai., 2003). Ha a DNS-javító rendszer a túl sok DNS-károsodás következtében túlterhelt lesz, és nem tudja kellő jósággal a hibákat kijavítani, a sejtben apoptózis indukálódik (Abid-Essefi és mtsai., 2004), ahogy a nagymértékben felhalmozott ROS-ok is stresszt jelentenek, amelyek programozott sejthalálhoz vezethetnek. Az apoptózis ugyanakkor fontos szerepet játszik a szervezetek normális fejlődésében és homeosztázisában. Számos morfológiai és biokémiai változás jelzi a folyamatot (Wu és mtsai., 2008). HepG2 sejteken a ZEA koncentráció- és időfüggően indukál apoptózist a mitokondriális útvonalon keresztül (Bouaziz és mtsai., 2008). Mivel a toxin a májban bomlik, ezért az a ZEA egyik fő célpontjának tekinthető, amelyben léziókat, karcinómát okozhat (Abid-Essefi és mtsai., 2004). A sejtek az apoptózisra jellemző magmorfológiai változásokat mutatják: DNS-kondenzációt és -fragmentációt, miközben a plazmamembrán permeabilitása nem változik (Bouaziz és mtsai., 2008).

Szintén humán HepG2 sejteken mutatták ki, hogy ZEA hatására megemelkedik a p53 gén expressziója. A p53 egy kizárólag emlősökben megtalálható transzkripciós faktor, amely nagyszámú gén ki- és bekapcsolásában játszik szerepet, amelyek a sejtciklus megállításában, a DNS javításában vagy az apoptózis elindításában vesznek részt. Ha a javítás nem sikerül, a proapoptotikus Bcl2 fehérjecsalád génjei expresszálódnak, amelyek szintén a mitokondriális útvonalat aktivizálják (Ayed-Boussema és mtsai., 2008).

A mitokondriális változások oka és következménye egyaránt lehet az oxidatív stressz (Bouaziz és mtsai., 2008). A ZEA által előidézett oxidatív stressz majdnem minden sejtstruktúrát megtámadhat, beleértve a membránlipideket, proteineket és a DNS-t (Hassen és mtsai., 2007). ZEA-kezelés hatására megnövekszik a Caco-2 sejtekben a malondialdehid (MDA) mennyisége, amely az oxidatív stressz és azon keresztül a lipid-

peroxidáció egyik késői biomarkere. A lipid-peroxidációval keletkező reaktív oxigéngyökök és szabadgyökök a célsejtek lézióját okozhatják. Az MDA megváltoztatja a sejtmembrán struktúráját és funkcióját, és blokkolja a sejtek anyagcsere-folyamatait, ezzel citotoxicitást indukál (Abid-Essefi és mtsai., 2004; Hassen és mtsai., 2007; Abid-Essefi és mtsai., 2009). ZEA-kezelés hatására dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát segítségével az össz-ROS mennyiségének emelkedését mutatták ki Vero (Abid-Essefi és mtsai., 2012), HepG2 (Bennour és mtsai., 2008; Bouaziz és mtsai., 2008; Gazzah és mtsai., 2010) és HL-60 (Stadnik és mtsai., 2010) sejtvonalakon is, azonban a különböző ROS-ok termelődésének arányát külön-külön még nem vizsgálták.

Az oxidatív stressz káros hatásait ellensúlyozandó, a sejtek különböző antioxidánsokat vonultatnak fel, aktiválják a sérüléseket eltávolító és kijavító rendszereket és az adaptív válaszokat. A vizsgált Balb/c egerek májában és veséjében akut ZEA-kezelés hatására lecsökkent a GSH mennyisége (Salah-Abbès és mtsai., 2008), valamint idő-és koncentráció-függő GSH-kiürülést mutattak ki ZEA-val kezelt HepG2 sejtvonalon is (Hassen és mtsai., 2007). Nem bizonyított azonban, hogy a GSH mennyiségi csökkenése a megborult oxidoredukciós egyensúly következménye, vagy pedig a megemelkedett ROS mennyisége GSH-fogyasztó folyamatokat indít el annak kompenzálására. A különböző antioxidáns enzimek aktivitás-változásai ellentmondásosak különböző akut tesztekben. Míg a CAT és SOD aktivitás csökkent a kezelt egerek veséjében (Salah-Abbès és mtsai., 2009), addig ugyanezeknek az enzimeknek az aktivitása nőtt az egerek heréjében (Boeira és mtsai., 2012), bár a ROS-koncentrációt ezekben a kísérletekben nem vizsgálták. ZEA-val kezelt Vero sejtek esetében 3,5-szeresére növekedett a CAT aktivitása, miközben az össz-ROS mennyisége 80-szorosára emelkedett (Abis-Essefi és mtsai., 2012).

III.3.3. A patulin

III.3.3.1. Történeti áttekintés

A patulint (PAT) először Birkinshaw és mtsai. izolálták 1943-ban a *Penicillium patulum*ból (most *Penicillium griseofulvum*) egy olyan törekvés részeként, amely új, antibioktikum-tulajdonságokkal rendelkező gomba-metabolitok után kutatott (Birkinshaw és mtsai., 1943). Ugyanezt a metabolitot izolálták más fajokból, és a clavacin, claviformin, expansin, mycoinC, penicidin neveket adták neki (Bennett és Klich, 2003).

A felfedezését követően kihasználták antibiotikus aktivitását, pl. orr- és toroksprayként alkalmazták megfázás kezelésére, kenőcsként gomba okozta bőrmegbetegedésekre tesztelték. Hatásai az 1950-es és 1960-as években váltak

nyilvánvalóvá: antibakteriális, antivirális, antiprotozoális aktivitása mellett kimutatták, hogy toxikus a növényekre és állatokra. Az orvosi gyakorlatban a '60-as évekig használták antibiotikumként, amikor újraosztályozták mikotoxinként (Bennett és Klich, 2003). A PAT nagyfokú affinitást mutat a fehérjék szulfhidril-csoportjaival. Ezen tulajdonságának következménye a citotoxikus hatás (Omar, 2013).

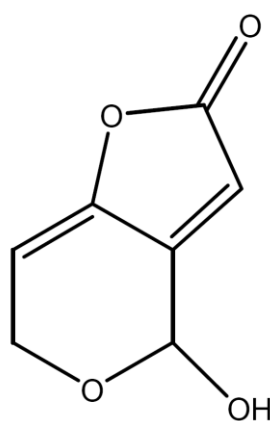
III.3.3.2. Termelő törzsek

Számos PAT-t termelő penészgomba törzset írtak le, közülük a legfontosabbak az *Aspergillus*, *Byssochlamys* és *Penicillium* törzsek (Dombrink-Kurtzman és Blackburn, 2005).

A *Penicillium* és *Aspergillus* fajok jellemzően ún. pre-harvest, tehát betakarítás előtti szennyezői a különböző gyümölcsöknek, és ebben a stádiumukban termelik a patulint. Néhány *Byssochlamys* faj azonban a pasztörözési eljárásan átesett almalében termeli a PAT-t, kihasználva, hogy túléli a hőkezelést (Sant'Ana és mtsai., 2008).

III.3.3.3. A PAT fizikai és kémiai tulajdonságai, előfordulása

A PAT (2-hidroxi-3,7-dioxabicyclo[4.3.0]nona-5,9-dién-8-on) (6. ábra) moláris tömege 154,12 g/mol, olvadáspontja 110 °C, vízoldható vegyület, hőstabil, molekuláris formája: C₇H₆O₄, poliketid. Savas közegben stabil, de alkalikus pH-n instabil, ami a laktongyűrű hidrolíziséhez vezet. Emellett az alkoholos fermentáció, a SO₂ és a hozzáadott C-vitamin is képes a PAT mennyiségének jelentős csökkentésére (Dombrink-Kurtzman és Blackburn, 2005).



6. ábra. A PAT szerkezeti képlete (Iwahashi és mtsai., 2006).

A világon széles körben elterjedt toxin, napjainkban az alma, a körte, a cseresznye és sok más gyümölcs rothadása során jelent veszélyt, a legtöbb PAT-szennyezés innen ered. Az étkezésben a penészes almából készült almalé tekinthető fő patulinforrásnak,

(Bennett és Klich, 2003; Dombrink-Kurtzman és Blackburn, 2005; Sant'Ana és mtsai., 2008).

Többféle szabályozás is van a PAT élelmiszerekben megengedhető maximális mennyiségét illetően. A *Scientific Committee for Food* megállapítása szerint a maximális napi bevitel mennyisége 0,4 µg/testtömeg kg. A *WHO* által engedélyezett mennyiség 50 µg/l almalé (Drusch és Kaeding, 2005). Maximális megengedhető mennyisége az élelmiszerekben 500 ppb (Saxena és mtsai., 2009). Maximális mennyisége gyümölcslevegekben és a belőlük készült termékekben 50 µg/l az *FDA* megállapítása szerint is. Európai Unió előírások szerint a szilárd halmazállapotú almatartalmú termékekben megengedett mennyiségük 25 µg/l, míg gyümölcslevegekben 10 µg/l (Sant'Ana és mtsai., 2008).

III.3.3.4. A PAT hatása magasabbrendű eukarióta szervezetekre

A PAT akut toxikus LD₅₀ értéke rágcsálók esetében 29-55 mg/testtömeg kg. A baromfik kevésbé bizonyultak érzékenynek, esetükben az LD₅₀ érték 170 mg/testtömeg kg. Az akut toxicitás jelei a görcsök, nehézlégzés, vértolulás a tüdőben, ödéma, fekélyek, vérbőség, és a gasztrointesztinális traktus puffadása valamint haemorrhagia, és az epitheliális sejtek kóros elváltozásai (Sant'Ana és mtsai., 2008; Puel és mtsai., 2010).

Szubakut dózissal kezelve patkányokat, azoknál súlycsökkenés volt megfigyelhető, valamint változások a gyomor- és béltraktusban és a vesefunkciókban. Az ismételt kezelések hatására neurotoxikus tünetek voltak megfigyelhetőek (pl. remegés, görcsök), valamint bizonyos enzimek gátlása a béltraktusban és az agyban (Puel és mtsai., 2010).

Krónikus hatásaiként kiemelhető, hogy genotoxikus, neurotoxikus, immunotoxikus, immunszuppresszív, teratogén és karcinogén (Sant'Ana és mtsai., 2008).

III.3.3.5. A PAT sejtszintű hatásai

A PAT elektrofil vegyület, toxikus hatását úgy fejtí ki, hogy kovalensen kötődik a makromolekulák - fehérjék és aminosavak - szulfhidril-csoportjaihoz (Liu és mtsai., 2007). Telítetlen α,β-laktongyűrűje könnyedén reagál a szulfhidril-csoportokkal, valamint lassabban az NH₂-csoportokkal. Ebből következően számos sejtfunkciót gátló hatása ismert. Toxikus hatása függ a koncentrációtól, az alkalmazás módjától, az SH-csoportot tartalmazó anyagok jelenlététől vagy hiányától és a közeg pH-jától (Lee és Röschenhaler, 1986). Kölcsönhatásba lép a cisztein-, lizin-, hisztidin oldalláncokkal, és α-aminosavakkal. Keresztkötések jöhetnek létre egy fehérjemolekulán belül, valamint két azonos vagy nem

azonos fehérjemolekula közt is, ezzel komolyan megzavarva a fehérjék sejten belül betöltött szerepét (Fliege és Metzler, 1999).

A PAT citotoxikus hatása is abból a tulajdonságából ered, hogy képes adduktokat formálni a legkülönbözőbb sejten belüli komponensek cisztein-tartalmú fehérjéivel. Sok, aktív helyén SH-csoportot tartalmazó enzimet képes gátolni, ilyenek pl. a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -függő ATPáz, az RNS-polimeráz, az aminoacil-tRNS-szintáz és az aldoláz. Szintén a PAT citotoxikus hatásának következménye a különböző fehérjék módosítása prenilációval, valamint a transzkripció megzavarása (Moake és mtsai., 2005).

Sok emlős sejtvonalon vizsgálták a PAT életképességre gyakorolt hatását. Többek között humán embrionális vese (HEK293), sertés proximális tubulus hámsejt (LLC-PK1) és kínai hörcsög ovárium eredetű epiteliális (CHO-K1) sejtvonalon is csökkent életképességet figyeltek meg toxin-kezelés hatására (Liu és mtsai., 2003; Heussner és mtsai., 2006; Ferrer és mtsai., 2009).

Számos munka fényt derített a PAT direkt és indirekt DNS-károsító hatására, melynek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy genotoxikus hatású. Sejtmentes környezetben a PAT gátolja a tubulin-dimerek mikrotubulussá polimerizálódását azáltal, hogy kovalens kötést létesít a tubulin tiolcsoportjaival, amelyek esszenciálisak a heterodimerek mikrotubulussá polimerizálódásában. Emellett a mikrotubulus-fehérje kevés számú szulfhidril-csoportja is szükséges a polimerizációhoz (Pfeiffer és mtsai., 1998).

A mikrotubulusok kialakulásának gátlása miatt a húzófonalak sejtosztódáskor nem működnek megfelelően, ez eredményezi a PAT különböző genotoxikus hatásait. A metafázisos kromoszómákon strukturális elváltozásokat okoz, valamint a citoskeleton szétszakadását is előidézi hepatoma sejteken (Pfeiffer és mtsai., 1998). Klasztogén hatású, mivel DNS-szálltöréseket okoz több sejtvonalon is (Alves és mtsai., 2000; Liu és mtsai., 2003; Schumacher és mtsai., 2006). Aneuploidiát, vagyis a kromoszómák számbeli változását is előidézi a mikrotubulus-polimerizáció zavarán keresztül (Pfeiffer és mtsai., 1998). PAT-kezelés hatására mikronukleuszok alakulnak ki kínai hörcsög V79 tüdő sejtvonalon (Pfeiffer és mtsai., 1998), valamint a sejtmag fragmentációja és a kromatin kondenzációja is megfigyelhető HL-60 sejtvonalon (Wu és mtsai., 2008). Mindezen genotoxikus hatások ellenére azonban az Ames-teszt negatív eredményt adott több *Salmonella* törzsön is, tehát ezen eredmények alapján nem mondható mutagénnek (IARC, 1986; Würzler és mtsai., 1991).

Egy PAT molekula három ciklikus adduktumot alakít ki a GSH-val, amelyek a glutaminsav és a cisztein α -aminocsoportjaival mutatott nukleofil aktivitásából erednek

(Fliege és Metzler, 1999). A PAT tiol-csoport támadáspontjának következtében az oxidatív stressz elleni védekező rendszer elemei közül főként a GSH-szint változásait vizsgálták több sejtvonalon is (Barhoumi és Burghardt, 1996; Schumacher és mtsai., 2005; Zhou és mtsai., 2010). Minden esetben megnövekedett GSH-bioszintézist tapasztaltak PAT-kezelés hatására, amely általában hamar kiürült a sejtekből. A gyors csökkenés oka, hogy az oxidatív stressz mérséklése közben ürül ki a sejtekből (Zhou és mtsai., 2010).

A glutation-homeosztázisban bekövetkező zavarok okaként és következményeként egyaránt kialakulhat oxidatív stressz. Az össz-ROS mennyiségének idő- és koncentrációfüggő emelkedését figyelték meg PAT-tal kezelt HEK293, HL-60 (Liu és mtsai., 2007), CHO-K1 (Ferrer és mtsai., 2009), valamint HepG2 sejteken is (Zhou és mtsai., 2010) a dikloro-dihidro-fluoreszcein-diacetát festék oxidált formájának fluoreszcencia-intenzitás változásain keresztül.

A különböző ROS-ok közül csak a $O_2^{\cdot-}$ mennyiségi változásait vizsgálták részletesen, és kimutatták, hogy fokozott termelése nagyban hozzájárul az oxidatív stressz kialakulásához (Liu és mtsai., 2007). A ROS-ok tehetők felelőssé az oxidált lipidek és lipoproteinek termelődéséért (Liu és mtsai., 2007, Ferrer és mtsai., 2009, Zhou és mtsai., 2010).

A citoplazmában található CuZnSOD fontos szerepet játszik a PAT-kezelés hatására keletkező $O_2^{\cdot-}$ semlegesítésében. A CuZnSOD-ot overexpresszáló sejtek membránja sokkal ellenállóbb volt rövidtávú PAT-kezelésre, ám hosszútávon nem mutatkozott különbség a normál SOD-szintű sejthez viszonyítva (Liu és mtsai., 2007).

PAT hatására *S. cerevisiae* élesztőben aktiválódik a kéntartalmú aminosav-anyagcsere, különösen a cisztein-szintézis. A cisztein szulfát és szénváz felhasználásával különböző enzimek hatására szintetizálódik. Olyan gének is indukálódnak, amelyek részt vesznek a stresszválaszban. Ilyenek a Hsp-ek, gyökfogókat, tiol-specifikus antioxidánsokat, különféle transzportereket kódoló gének. Az oxidatív stressz elleni védekezésben résztvevő enzimek indukálódott génjei közül a GST, a tioredoxin, az alkil-hidroperoxid-reduktáz, a glutaredoxin, a GPx, a metionin-szulfoxid-reduktáz és a SOD a legjelentősebbek (Iwahashi és mtsai., 2006).

Krónikus, 24 hétig tartó PAT-kezelés után vizsgálták az oxidatív stressz marker enzimeinek változásait egér bőrön. A kezelés hatására szignifikánsan megnövekedett a lipid-peroxidáció mértéke és a GST aktivitása, míg a GSH mennyisége, a GR, a CAT, a SOD-ok és a GPx aktivitása szignifikánsan lecsökkent (Saxena és mtsai., 2011).

A ROS-ok szubcelluláris üzenetvivő molekulákként is működnek számos szignálút vonal esetében. (Liu és mtsai., 2006). Az emlősökben a MAPK-ok három nagy alcsaládjá található meg; az extracelluláris szignál-szabályzott kináz (ERK), a p38 kináz és a c-Jun N-terminális kináz (JNK). Az ERK út vonal túlnyomórészt mitogének hatására aktiválódik és a sejttúléléshez, valamint a sejtosztódáshoz köthető a szerepe, míg a p38 kináz és a JNK elsősorban stressz hatásokra aktiválódnak és sok eltérő intracelluláris eseményhez köthetőek (Saxena és mtsai., 2011). A JNK és p38 stresszre adott válaszaik összefüggésben vannak a sejtciklus haladásával, a sejthalállal, a genom instabilitással és az oxidatív stresszrel (Liu és mtsai., 2006). A MAPK-ok az NF- κ B és AP-1 transzkripciós faktorokat aktiválják toxikus ingerekre különböző mechanizmusokkal az emlős sejtekben (Saxena és mtsai., 2011).

Western-blot használatával az időben folyamatosan monitorozva (1-72 h) *in vivo* nyomon követhető a patulin MAPK-aktiválása egér bőrön, amely alapján kiderült, hogy mind a három fő típusú kinázt aktiválta, mindazonáltal az aktiválás időpontja és a jel minden esetben változott. A JNK és NF- κ B korai aktivációja direkt válasz a PAT-ra, míg az ERK, p38, c-jun és c-fos késői aktivációja a ROS-ok növekvő mennyisége miatt következik be (Saxena és mtsai., 2011). HEK293 sejtvonalon szintén idő- és koncentrációfüggő emelkedés figyelhető meg a p38, JNK és ERK foszforilációjában is (Liu és mtsai., 2006).

A PAT által indukált sejt-proliferáció a MAPK-út vonal aktiválódásán keresztül a későbbiekben tumorok kialakulásához vezethet, míg a p38 kináz út vonal részben felelős a PAT által előidézett apoptózisért, amelyet HEK293 sejtvonalon vált ki (Liu és mtsai., 2006; Saxena és mtsai., 2011).

HL-60 sejteken 6 órás, alacsonyabb koncentrációjú kezelés hatására az apoptózis morfológiai jelei, mint a plazmamembrán hólyagosodása, a nukleáris fragmentáció, a kromatin-kondenzáció és a DNS létrázódása megfigyelhetőek. Molekuláris szinten is észlelhetőek a változások, mert a kaszpáz-9, majd a kaszpáz-3 is aktiválódik. A kaszpáz-9 aktivitásából következik, hogy a PAT-indukált apoptózist az intrinszik, mitokondriális út vonal közvetíti. A mitokondriumban található antiapoptotikus fehérje, a Bcl2 mennyisége lecsökken, míg a citokróm-c kiáramlása megnövekszik (Wu és mtsai., 2008).

Egérbőrön egyszeri felszíni PAT-kezelés hatására megemelkedett a p53, Bax és p21/WAF1 fehérjék expressziója 24, 48 és 72 órás kezelést követően, ahogy időfüggően emelkedett az apoptotikus sejtek aránya Annexin-V, propidium-jodid (PI) jelöléssel nyomon követett áramlási citometriás vizsgálatban, és a citokróm-c és kaszpáz-3

aktivitásának növekedése is megfigyelhető volt. Mindezek szintén az apoptózis jellemző markerei (Saxena és mtsai., 2009).

Válaszolva a DNS-t ért károsodásokra, a p53 aktiválja azokat a sejtciklust szabályzó elemeket, amelyek megállítják a sérült sejtek osztódását. Ennek hatására upregulálódik a p21 fehérje, amely megállítja a sejtciklust, időt adva a DNS károsodásainak kijavítására. Ha ez nem történik meg, akkor a p53 az apoptózis irányába mozdítja el a folyamatokat a pro-apoptotikus fehérje, a Bax expressziójának indukciójával (Saxena és mtsai., 2009).

IV. Célkitűzések

A PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékén 1994 óta folynak az élesztők (*S. pombe*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*) oxidatív stressz folyamatainak vizsgálatát célzó kutatások, amelynek keretében több oxidatív stresszor hatásmechanizmusának leírására is sor került. A különböző mikotoxinok hatásának, elsősorban az általuk indukált oxidatív stressznek a vizsgálata 2006-ban kezdődött meg tanszékünkön. Ennek keretében első lépésként kiválasztásra kerültek azok a toxinok (patulin, zearalenon és citrinin), amelyek kölcsönhatást mutattak a *S. pombe*-vel. Ezután a többlépcsős kutatási program keretében ennek a három mikotoxinnak a hatásmechanizmus vizsgálata zajlott 2014-ig. Az ez idő alatt megszerzett információkra alapozva további tervként szerepel a mikotoxinok interakciójának vizsgálata, amely jelenleg kevésbé kutatott területnek számít.

A kutatócsoportban végzett munkám fő részeként ösztrogén-receptorral vagy azzal analóg szekvenciával nem rendelkező hasadó élesztő sejteken terveztük meghatározni a ZEA mikotoxin nem ösztrogén-specifikus citotoxicitását, a sejtben lejátszódó oxidatív stresszfolyamatokat és azok szabályozását, valamint azonosítani a ZEA lehetséges támadáspontjait.

Vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1.1. Van-e citotoxikus hatása a ZEA-nak az *S. pombe* sejtekre? Milyen mértékben gátolja a toxin a sejtek szaporodását, illetve mekkora mértékű sejtpusztulást idéz elő?
- 1.2. Létezik-e adaptáció a toxinnal szemben, és ha igen, milyen jelátviteli útvonalon keresztül szabályozódik?
- 1.3. Milyen mértékű oxidatív stresszt idéz elő a toxin a sejtekben? Hogy alakul a különböző ROS-ok – $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$ – intracelluláris mennyisége?
- 1.4. Az előidézett oxidatív stresszre hogy válaszol a sejt, miként szabályozza az antioxidáns enzimeinek specifikus aktivitását, illetve a GSH sejtben belüli koncentrációját?
- 1.5. Van-e direkt interakció a ZEA és a GSH között?
- 1.6. A ZEA által kiváltott oxidatív stressz hatására bekövetkezik-e DNS-károsodás? Ha igen, megkísérli-e a sejt a javítást a sejtciklus blokkolásával? Ha a folyamat eredménytelen, indukálódik-e programozott sejthalál?
- 1.7. Mivel a ZEA szerkezeti hasonlóságot mutat az ergoszterinnel, felmerült a kérdés, hogy befolyásolja-e a ZEA-kezelés a sejt szterin-összetételének arányait?

Munkám másik része a tanszéken már korábban kutatott mikotoxinnal a PAT hatásmechanizmusával volt kapcsolatos. Előzetes vizsgálatok alapján bizonyítást nyert és ismertté vált a toxin fő támadáspontja, a fehérjék SH-csoportjai, valamint a toxin membrán perturbáló hatása. Kutatócsoportunk részletesen vizsgálta a PAT által előidézett oxidatív stressz főbb folyamatait is, így a különböző termelődött gyökök arányát, illetve a ROS-ok emelkedésére reagálva a különböző antioxidáns enzimek aktivitásváltozásait.

További kérdésként merült fel azonban, hogy:

- 2.1. Mindezek a folyamatok milyen jelátviteli útvonalon keresztül szabályzódnak a sejten belül?
- 2.2. Bekövetkezik-e a DNS-t érintő oxidatív károsodás? Ha igen, akkor akkora mértékű-e, hogy apoptózist váltson ki, amelynek a sejtmagmorfológiai jelei érzékelhetőek?
- 2.3. Az általunk használt fotolumineszcens és polarizációs módszerek segítségével kimutatható-e a közvetlen kölcsönhatás az ismert SH-csoportokkal keresztükötő PAT és a GSH között?

V. Anyag és módszer

V.1. A *S. pombe*

A vizsgálatainkhoz az *S. pombe* ura4⁻D18 h⁻, heterotallikus, uracil-auxotróf törzset használtuk. A jelátviteli útvonal vizsgálatához a szülői törzset (leu 1-32 ura4-D18 his 7-366 ade6-M210, h⁺), valamint deléciós mutánsait: $\Delta atf1$ (atf1::ura4 leu 1-32 ura4-D18, h⁺), $\Delta wis1$ (wis1::ura4 leu 1-32 ura4-D18, h⁻), $\Delta sty1$ (sty1::ura4 leu 1-32 ura4-D18 ade6-704, h⁺) és $\Delta pap1$ (pap1::ura4 leu 1-32 ura 4-D18, h⁺) törzset alkalmaztuk. A deléciós mutáns törzseket Dr. J. Millar (Division of Yeast Genetics, National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London) bocsátotta rendelkezésünkre.

Az ösztrogén receptor analógia vizsgálatához a *S. pombe* genomját BLAST program segítségével (2. webhely) összehasonlítottuk a humán β -ösztrogén receptor (ESR2) nukleotid és fehérje szekvenciáival (forrásadatok: 3. webhely), valamint a *C. albicans*ban található ösztrogén-kötő fehérjével (Madani és mtsai., 1994).

V.2. Törzsfenntartás, kezelés

A törzsek fenntartása petri-csészén, 4 °C-on, a tartós tárolás 50%-ban glicerint tartalmazó tápoldatban -80 °C-on történt. Kísérleteinkhez mindig középlogaritmikus fázisú tenyészeteket használtunk, hogy a sejtek azonos fiziológiai állapotban legyenek. Minden kísérlet kezdő lépéseként a sejtek gyűjtése és mosása centrifugálással történt, 1017 g-n (3000 fordulat perc⁻¹), 5 percig.

A kísérletekhez 405,5 mM koncentrációjú PAT törzsoldatot, valamint 300 mM koncentrációjú ZEA törzsoldatot használtunk acetonnitrilben, illetve etanolban oldva. A kísérletek során az oldószer végkoncentrációját minden esetben 0,8%-ra állítottuk be.

V.3. Alkalmazott vegyszerek

Fluka: Dihidroetidium 37291

Reanal:

L-arginin	18480	DL-metionin	13085
D-glükóz	07071	NaCl	24640
L-lizin	18900	KCl	18050
L-leucin	18830	KOH	18013

Sigma:

2-propanol (izopropanol)	4057	K ₂ Cr ₂ O ₇	P-2588
4',6-diamidino-2-fenilindol	D-9542	Kümén-hidro-peroxid	C-0524
4-vinilpiridin	V-3877	Lizing enzim	L-3768
5-szulfoszlicilsav	S-2130	NADPH	N-1630
Adenin	A-8626	Nikotinamid-dinukleotid foszfát	N-0505
DETAPAC	D-1133	Nitro-blue-tetrazolium	N-6876
DHR 123	D-1054	Patulin	P-1639
DTNB	D-6749	Propidium-jodid	P-4170
Glükóz-6-foszfát	G-7879	Uracil	U-0705
GR	G-3664	Xantin	X-2502
GSH	G-4251	Xantin oxidáz	X-4875
GSSG	G-4376	Zearalenon	Z-2125
H ₂ O ₂	H-1009	β-ösztadiol	E-8875

Spektrum-3D:

KH ₂ PO ₄	11594	EDTA(Selecton B2)	59561
K ₂ HPO ₄	11321	trietanolamin	28743
Na ₂ EDTA	30029	HEPES	441485
MgCl ₂	87060	L-hisztidin	211438

VWR: Folin-Ciocalteu's reagens UN3264

V.4. Tápanyagok, táptalajok

SM + uracil tápanyag : 10 g l⁻¹ glükóz; 5 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 1 g l⁻¹ KH₂PO₄; 0,5 g l⁻¹ MgSO₄; 1000 µl Wickerham-féle vitaminoldat; 100 mg l⁻¹ uracil; szilárd táptalaj esetén 20 g l⁻¹ agarral kiegészítve; pH 4,5 (tápanyag esetén), pH 5,6 (táptalaj esetén)

YES táptalaj: 5 g l⁻¹ élesztő-kivonat; 30 g l⁻¹ glükóz; 225 mg l⁻¹ uracil, leucin, adenin, lizin, metionin, arginin, hisztidin, amelyek az auxotrófia miatt szükségesek; 2% agar; pH 5,6

YEL tápanyag: 5 g l⁻¹ élesztő-kivonat; 30 g l⁻¹ glükóz; 225 mg l⁻¹ uracil, leucin, adenin, lizin, metionin, arginin, hisztidin, amelyek az auxotrófia miatt szükségesek; pH 4,5

V.5. Növekedési görbe felvétele

Szilárd táptalajon növesztett tenyészetből egy inokulumnyi mennyiségű sejttel beoltottunk 10 ml tápanyagot, 30 °C-on inkubáltuk 24 órán át. A 24 órás álló tenyészetrel beoltottunk 100 ml tápanyagot (a tenyészet kiindulási optikai denzitása (OD) 595 nm-en

0,05). A tenyészeteket 30 °C-on, 150 fordulat perc⁻¹ –en rázattuk, és a 12. órától két óránként végeztünk mintavételt, meghatároztuk az optikai denzitásukat 595 nm-es hullámhosszon, illetve Bürker-kamrás sejtszámolást végeztünk. A kapott adatokból meghatároztuk a sejtek generációs idejét:

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

ahol T = generációs idő; y = sejt ml⁻¹ a t_2 -nél; x = sejt ml⁻¹ t_1 -nél (4. webhely)

V.6. A ZEA, a β-ösztadiol és a PAT minimális gátló koncentrációinak meghatározása

A ZEA minimális gátló koncentrációját National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) standard mikrodilúciós módszerrel határoztuk meg (NCCLS, 2002) az *S. pombe* és jelátviteli útvonalban deléciós mutánsainak esetében.

48 órás ferdeagaros tenyészetéről (ura4D18 h⁻ esetében SM+uracil táptalaj, deléciós mutánsok esetén YES táptalaj) a sejteket felvettük tápoldatban (SM+uracil illetve YEA), és beállítottuk a sejtszámot 5 × 10³ db sejt ml⁻¹-re. A MIC₁₀₀ illetve MIC₅₀ értékeket mikrotitrátor lemezen határoztuk meg a tenyészetek optikai denzitásának mérésével (595 nm-en). A méréshez steril, egyszer használatos, 96 lyukú mikrotitrátor lemezt (microplate) használtunk, a lyukakba 1:1 arányban bemérve a különböző koncentrációjú ZEA oldatokat és a sejtuszpenziót (100–100 μl). A vizsgálandó toxinkoncentrációkat felező hígítási sor segítségével állítottuk be (1000 μM, 500 μM, 250 μM, 125 μM), kontrollként 100 μl sejtuszpenziót használtunk, vakként pedig 200 μl tápoldatot (amelynek abszorbancia-értékét később kivontunk az összes mért optikai denzitás értékből). 30 °C-on 48 óráig inkubáltuk a lemezeket. A minták leolvasása előtt a mintákat felszuspendáltuk, majd a mérést Thermo Scientific Multiskan Ex Primary EIA V. 2.3 készülékkel végeztük el. A kiértékelés Ascent Software Version 2.6 programmal történt.

A β-ösztadiol minimális gátló koncentrációjának meghatározásakor a ZEA-val megegyező koncentrációkkal és -módon dolgoztunk SM tápoldatban, a törzsoldat 185 mM-os volt.

A PAT esetében a felező hígítási sor végkoncentrációi 600 μM, 300 μM, 150 μM, 110 μM, 75 μM, 50 μM voltak.

V.7. A ZEA felvétel-kinetikája

A felvétel-kinetika meghatározásához első lépésként meghatároztuk a ZEA abszorpciós spektrumát Spectronic Genesys 2 típusú spektrofotométerrel. A mérést 0,6 M-os KCl-oldatban végeztük. A spektrumot 1 nm-enként vettük fel, 200 és 400 nm között. A spektrumból meghatároztuk az abszorpciós maximumot (269 nm), majd ezen a hullámhosszon lemértük a 100 μM ZEA-ból készített felező hígítási sor minden elemének abszorbanciáját. A kapott értékek alapján kalibrációs görbét készítettünk.

A 16 órás, közép-logaritmikus fázisú sejteket centrifugáltuk, mostuk és felvettük 0,6 M-os KCl-ban. A sejtfales sejtek esetében a sejtszámot rögtön beállítottuk 10^7 db sejt ml^{-1} -re.

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 KCl-ban. Ezt követően a sejtszámot újra 10^7 db sejt ml^{-1} -re állítottuk be.

Ezt követően 500 μM ZEA-val kezeltük a sejteket, és különböző időpontokban (0, 5, 10, 20, 30, 60 perc) mintát vettünk. A sejteket centrifugáltuk, a felülúszót 269 nm-en, húszszorosára hígítva fotometráltuk és a kalibrációs görbe alapján meghatároztuk a sejtek által felvett ZEA koncentrációját.

V.8. A szaporodásgátlás megállapítása

A V.4. alapján készített 24 órás álló tenyészzel beoltottunk 15 ml minimál tápoldatot ($\text{OD}_{595}=0,05$). A tenyészeteket különböző koncentrációjú ZEA-oldattal (100 μM , 500 μM , 1000 μM) kezeltük. A tenyészeteket 30 °C-on, 150 fordulat perc^{-1} -en ráztuk, a 12. órától kezdve négyóránként mintát vettünk, és meghatároztuk a szuszpenzió optikai denzitását 595 nm-en.

V.9. Pusztítási görbe felvétele

24 órás álló tenyészetből készített 16 órás középlog fázisú tenyészetet centrifugáltunk, mostunk, majd SM tápoldatban felvettük a sejteket. A sejtszámot 10^6 db sejt ml^{-1} -re állítottuk be, a szuszpenziót félkémcsövekben osztottuk szét 2 ml-enként. Különböző ZEA-koncentrációkkal (0 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM) kezeltük a sejtsuszpenziót 30 °C-on, 150 fordulat perc^{-1} -en rázatva, majd 30 és 60 perc után mintát vettünk. A mintákat 100-szorosára hígítottuk SM tápoldatban, majd 3-3 Pertri-csészére szélesztettünk 50-50 μl -t. Az értékelést 4 nap múlva végeztük. Minden esetben a kontroll

telepszámot vettük 100 %-nak, a kezelt minták telepszámát ehhez viszonyítottuk (Lee és mtsai., 1995).

A pusztítási görbe alapján megállapítottuk azt a szubletális koncentrációt, amelynél a sejtek több mint 80%-a túlél egy órás kezelést követően. Ezt a koncentrációt használtuk az adaptációs kísérleteknél a sejtek egy órás előkezeléséhez.

V.10. Az adaptáció vizsgálata

A középlog fázisú rázatott tenyészetet centrifugáltuk, mostuk, 10^6 db sejt ml^{-1} -es sejtszám-beállítás után (SM+uracil tápoldatban) a mintákat kettéválasztottuk. Az egyik mintához hozzáadtuk a szubletális koncentrációjú ZEA-t ($250 \mu\text{M}$), a másikhoz megegyező mennyiségű oldószert (etanol). Ezután a sejteket egy órán keresztül előkezeltük $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, $150 \text{ fordulat perc}^{-1}$ -en. Ezután a mintákat centrifugáltuk, mostuk, és tápoldatban felvettük. Hozzáadtuk különböző koncentrációkban a ZEA-t ($0 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$, $1000 \mu\text{M}$), egy órán keresztül kezeltük a mintákat, és félóránként mintát vettünk, melyet 100-szorásra hígítottunk, majd $50\text{-}50 \mu\text{l}$ -t 3-3 darab SM+ura táptalaj tartalmú Petri-csészére szélesztettünk. 4 nap múlva végeztük a kiértékelést. Minden esetben a kontroll sejtszámot vettük 100%-nak, a többi minta telepszámát ehhez viszonyítottuk (Lee és mtsai., 1995).

V.11. Az intracelluláris peroxid-koncentráció mérése

A középlog fázisban lévő sejteket centrifugáltuk, mostuk, és SM+ura tápoldatban vettük fel. Ezután a sejtszámot beállítottuk 10^6 db sejt ml^{-1} -re. A sejtszuszpenziót 15 percig kezeltük $500 \mu\text{M}$ ZEA-val. Ezután $500 \mu\text{l}$ mintához $1 \mu\text{l}$, 5 mM -os dihidrorodamin 123 (DHR123)-t adtunk jelölő festékként.

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

V.12. Az intracelluláris szuperoxid-koncentráció mérése

A sejteket a V.10. fejezetben leírtakkal egyezően készítettük elő és kezeltük. Ezután $500 \mu\text{l}$ mintához $1 \mu\text{l}$, 5 mM -os dihidroetidium festéket adtunk. A méréshez BD FACS Calibur típusú áramlási citométert használtunk. 15, 30, 45 és 60 perc elteltével mértük a peroxid-koncentráció változását, $\lambda_{\text{ex}}=488 \text{ nm}$ és $\lambda_{\text{em}}=585 \text{ nm}$ (FL2 szenzor) 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.13. A minták előkészítése hidroxilgyök és enzimaktivitás mérésekhez

A közép-logaritmikus fázisú tenyészeteket 4 °C-on centrifugáltuk, majd mostuk 25 ml fiziológias sóoldatban. 10^7 db sejt ml^{-1} -es szuszpenziót kezeltünk 500 μM ZEA-val egy órán át. A tenyészetet centrifugáltuk, kétszer mostuk, majd felvettük 4 ml jégen tartott foszfát-pufferben és egy 25 ml-es főzőpohárba raktuk, melynek a belső átmérője 15 mm-nél nem nagyobb (a feltáró készülék belső átmérőjénél nem lehet nagyobb), majd azonnal -20 °C-ra hűtöttük. Leghamarabb 4-5 órán belül kezdtük el a sejtfeltárást.

Sejtfeltáráshoz svéd gyártmányú X-PRESS készüléket használtunk (X-PRESS 25 ml, AB BIOX, Sweden), amelyet használat előtt már 24 órával -20 °C-os hűtőbe tettünk. Két feltárás között legalább két órán keresztül hűtöttük a készüléket -20 °C-on. Miután behelyeztük a mintát az X-press készülékbe, még húsz percig a fagyasztóban hagytuk. Feltárás után a mintát még napokig, legfeljebb egy hétig tároltuk -20 °C-on, a később felhasználásra kerülő mintákat a felhasználásig -80 °C-on tároltuk (Emri és mtsai., 1994).

V.14. Az intracelluláris hidroxilgyök mérése

A mérés napján gyakori keverés mellett szobahőmérsékleten engedték fel a mintákat. 50 μl fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) oldatot közvetlenül az Eppendorf csövekbe mértünk (5 mg PMSF-t feloldunk 500 μl izopropanolban), majd a mintából felolvadás után azonnal 1450 μl -et adtunk a már Eppendorf csőben lévő PMFS oldathoz. Hűtött centrifugában 10 000 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-nitron (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. 10 ml 20 mM-os Cr(VI) törzsoldat desztillált vízben oldva.

A méréshez ESP 300E típusú spektrométert használtunk. A Cr(VI) és NADPH oldatokat tízszeresre hígítva használtuk. Mérés során a reakció végtérfogata 150 μl volt, a

méréshez 120 µl-es kapillárist használtunk. A méréshez a következő összetevőket mértük össze a következő sorrendben:

PBN + Cr(VI): 90 µl puffer, 30 µl minta, 15 µl PBN, 15 µl 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 (10 µM) használtunk. (10 µM 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; amplitudó 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.15. Glutation-koncentráció és enzimaktivitás mérések

A fagyasztott mintákat a mérés napján a hidroxilgyök mérésénél leírtakhoz hasonlóan (V.12.) 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.15.1. A glutation-koncentráció mérése

A mintánkat kettéosztottuk, egyik felének megmértük a szárazanyag-tartalmát, míg a másik felét centrifugáltuk, mostuk és 4 ml 4 °C-os, 5%-os szulfoszalicilsav oldatban vettük fel, majd erősen vortexeltük. Ezután a mintákat 4 °C-on 20 percig inkubáltuk. 10 percig 10 000 fordulat perc⁻¹ fordulatszámom centrifugáltuk, majd a felülúszóval dolgoztunk tovább. A mérés teljesen megegyezik az alább leírt GSSG-méréssel, azzal a különbséggel, hogy GSH-mérésnél nem végeztük el a 4-vinilpiridines kezelést, csak a trietanolaminos közömbösítést. Az így kapott jel az össz-GSH, amiből le kell vonni a GSSG értékét (Anderson, 1995).

V.15.2. Az oxidált glutaion koncentrációjának mérése

A minta készítése megegyezik az előbbiekben leírt GSH-méréssel, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a GSH-t a mérés elején egy órás vinilpiridines kezeléssel elreagáltattuk. 600 µl mintát (illetve a referencia oldatnál a szulfoszalicilsavat) eppendorf csőbe raktuk, hozzáadtunk 12 µl 4-vinilpiridint és ezt követően 25 µl trietanolamint. A pH-t 6 és 7 közötti értékre állítottuk. 1 órán keresztül inkubáltuk 4 °C-on.

A méréshez a következő puffert használtuk: 100 ml desztillált vízben 1,973 g NaH_2PO_4 -ot és 2,232 g Na_2EDTA -t oldottunk fel (pH 7,5).

Frissen készítettük az alábbi oldatokat:

a-oldat: 0,248 mg NADPH-t oldottunk fel 1 ml pufferben.

b-oldat: 10 mg 5,5-ditio-bisz(2-nitrobenzoik sav)-t 5 ml pufferben oldottunk fel.

c-oldat: 60 μl GR-t 540 μl desztillált vízben oldottunk fel.

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

GSH mérésénél: 10 μl minta, 90 μl puffer, 800 μl a-oldat, 100 μl b-oldat, 20 μl c-oldat.

GSSG mérésénél: 100 μl minta, 800 μl a-oldat, 100 μl b-oldat, 20 μl c-oldat (a küvetta falához cseppentve). Összerázás után 1 percig mértünk 412 nm-en. Kalibrációkor először kalibráló oldatot készítettünk: 36 ml 5%-os szulfoszalicilsavhoz adtunk 2,2 ml trietanolamint (pH 6-7 között). GSH kalibráció: 4,6 mg GSH-hoz adtunk 7,5 ml kalibráló oldatot (GSH koncentráció: 2000 μM volt). Kalibráló oldattal ezt az oldatot tízszeresére hígítottuk, így a kapott oldat koncentrációja 200 μM lett. Ezután a 200 μM -os GSH-oldatból készítettük el az alábbi GSH-koncentrációt tartalmazó oldatokat: 0 μM -os oldat, 25 μM -os oldat, 50 μM -os oldat, 100 μM -os oldat.

GSSG kalibráció: 4,6 mg GSSG-hez adtunk 7,5 ml kalibráló oldatot (a GSSG koncentrációja: 1000 μM). Ezt az oldatot tízszeresére hígítottuk kalibráló oldattal, így a kapott oldat töménysége 100 μM lett. Ezután a 100 μM -os GSSG-oldatból készítettük el az alábbi koncentrációjú GSSG-oldatokat: 0 μM -os oldat, 6,25 μM -os oldat, 12,5 μM -os oldat, 25 μM -os oldat. Számolásnál a kalibráló oldatok segítségével meghatároztuk a mintánk GSH- és GSSG-tartalmát, majd a mért száraztömegre vonatkoztattunk (Anderson, 1995).

V.15.3. A szuperoxid-dizmutázok specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez az alábbi puffert készítettük: 100 ml steril desztillált vízben 53,3 mg dietiléntriáminpenta-acetiksavat (DETAPAC), 0,82 g K_2HPO_4 -ot és 44 mg KH_2PO_4 -ot oldottunk fel (pH 7,8). A puffert 4°C-on tároltuk. Frissen készítettük az alábbi oldatokat:

a-oldat: 5 ml pufferben 9,2 mg nitro-kék-tetrazóliumot (NBT) oldottunk fel (jégen, alufóliába burkolva tároltuk).

b-oldat: 10 ml pufferben 3,3 mg xantint oldottunk fel (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 ⁽⁶⁾

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.15.4. A kataláz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez 20 mM-os HEPES puffert használunk (pH 7,6). Frissen készítettük az alábbi oldatot: 9,82 M-os (30%-os) eredeti H₂O₂-oldatot 100-szorosára hígítottunk desztillált vízben (mindig közvetlenül a mérés előtt frissen készítettük), a mérés során jégen tároltuk. 240 nm-es hullámhosszon fotometrálunk a mintákat kvarcküvetében, 1 percen keresztül mértük az abszorbancia-változást. A mérés során a küvetébe a következő összetevőket mértük össze az alábbi sorrendben, majd intenzíven összeráztuk: 100 µl H₂O₂-oldat, 800 µl HEPES puffer, 100 µl minta. Referencia-oldatot mértünk a következő módszer alapján: pár másodpercre felforraltunk 100 µl mintát egy kémcsőben, majd ebből mértünk aktivitást. A minták abszorbancia-változását átlagoltuk és az átlagból számoltuk ki a kataláz-aktivitást az alábbi képlettel:

$$\Delta A = \Delta C d \epsilon x \quad (7)$$

Az egyenletben: ΔA : a mérés során az abszorbancia-változás, ΔC : ezt az értéket keressük, a szubsztrát fogyásának mennyiségét adja meg, d : a küvetta átmérője (1 cm), ϵx : extinkciós koefficiens, melynek értéke:

$$\epsilon_{H_2O_2, 240nm} = 4,36 \cdot 10^4 \frac{cm^3}{mol \cdot cm}$$

Ezután a mérés során a küvetében lévő fehérje mennyiségéből kaptuk meg a specifikus enzimaktivitást (a számolás során figyelembe vettük a minta hígítási arányát):

$$\text{enzimaktivitás: } x = \frac{C}{T\text{fehérje}}$$

Az egyenletben C: a szubsztrát fogyásának mennyisége, T fehérje: a minta fehérje tartalma mg ml⁻¹-ben (Pinto és mtsai., 1984).

V.15.5. A glutation-peroxidáz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez készítettünk 7,6-os pH-jú 50 mM-os Tris/HCl 0,091 mM Na₂EDTA-át tartalmazó puffert. A mérés előtt közvetlenül a következő oldatokat frissen készítettük, és a mérés során végig jégen tároltuk:

1. 1 mM-os NADPH oldat.
2. 1 mM-os GSH oldat.
3. Küméne hidroperoxid (CHP)-oldat (3,3 ml pufferbe 6 µl eredeti CHP oldatot mérünk).
4. GR oldat (20 µl enzimszuszpenziót 180 µl desztillált vízben oldottunk fel).

A mérés során a következő oldatokat mértük össze a következő sorrendben: 120 µl NADPH, 400 µl puffer, 20 µl GR, 250 µl GSH, 200 µl minta, 20 µl CHP. A mérést 340 nm-en végeztük 1 percig, amely során egyszerre két mintát mértünk. A mért értékeket a negatív kontrollhoz viszonyítottuk (enzim nélkül). Az enzimaktivitás számolását hasonlóan végeztük, mint a kataláz enzimaktivitásának számolását, kivéve, hogy itt a NADPH extinkciós koefficiensét helyettesítettük be az egyenletbe, mivel a NADPH fogyását mértük a reakció során (Chiu és mtsai., 1976).

$$\varepsilon_{NADPH,340nm} = 6,3 \cdot 10^6 \cdot \frac{cm^3}{mol \cdot cm}$$

V.15.6. A glutation-reduktáz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez 0,1 M-os foszfát puffert használunk (pH 7,6).

Mérés előtt közvetlenül frissen készítettük az alábbi oldatokat:

- 1) 1 mM NADPH
- 2) 10 mM GSSG.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze az alábbi sorrendben: 100 µl NADPH, 650 µl puffer, 150 µl GSSG, 100 µl minta. 340 nm-en fotometráltunk, 1 percig mértük az abszorbancia-változást. Az abszorbancia-változásokat átlagoltuk és ebből számoltuk ki az enzimaktivitást a glutation-peroxidáz mérésnél leírt egyenlet szerint, itt is a NADPH fogyását mérve (Pinto és mtsai., 1984).

V.15.7. A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez 20 mM-os HEPES puffert (pH 7,6) valamint 200 mM-os $MgCl_2$ oldatot készítettünk. A mérés napján frissen készítettük az alábbi oldatot:

A-oldat: 20 mM-os HEPES pufferben feloldottunk 3,15 mg glükóz-6-foszfátot, 7,5 mg NADP-t, hozzáadtunk 2,25 ml $MgCl_2$ oldatot, és az oldat térfogatát 20 mM-os HEPES pufferrel beállítottuk 15 ml-re. Ezt az oldatot nem tároltuk jeges vízben.. A mérés során a következő összetevőket mértük össze az alábbi sorrendben: 900 μ l A-oldat, 75 μ l puffer, 25 μ l minta. A mérést 340 nm-en végeztük, 1 percig. Az enzimaktivitás számolása megegyezik a GPx számolásával, itt a NADPH termelődésének koncentrációját mértük (Emri és mtsai., 1994).

V.15.8. A glutation-S-transzferáz specifikus enzimaktivitásának mérése

A méréshez 6,5-ös pH-jú 0,1 M-os foszfát-puffert használtunk, amely 1 mM Na_2EDTA -t tartalmazott. A mérés előtt frissen készítettük az alábbi oldatokat:

1. GSH oldat
2. 1-kloro-2,4-dinitrobenzén (CDNB) oldat etanolban oldva.

A mérés során a következő összetevőket mértük össze az alábbi sorrendben: 50 μ l CDNB oldat, 850 μ l puffer, 50 μ l minta, 50 μ l GSH.

340 nm-en mértünk 1 percig, egyszerre 2 mintát. A mért értékeket a minta helyett puffert tartalmazó negatív kontrollhoz viszonyítottuk. Az enzimaktivitás számolása megegyezik a GPx számolásával (Warholm és mtsai., 1985).

V.16. A fehérjetartalom mérése

A méréshez az V.11. fejezetben ismertetett módszerrel feltárt sejteket és előzőleg hőlég-sterilizálóban sterilizett tiszta kémcsöveket használtunk.

Törzsoldatok:

1. CTC-oldat (1 liter desztillált vízben 1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ -t, 2 g Na/K-tartarátot és 100 g Na_2CO_3 -ot oldottunk fel) 4 °C-on tároltuk.
2. Nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-oldat (50 ml desztillált vízben 2,5 g SDS-t oldottunk fel)
3. NaOH-oldat (100 ml desztillált vízben 3,2 g NaOH-ot oldottunk fel).
4. Folin-Ciocalteu's reagens (4 °C-on tároltuk).

Frissen készítettük az alábbi oldatokat:

A-reagens (CTC, SDS és NaOH 1:2:1 arányban mértük össze).

B-reagens (Folin-Ciocalteu's reagens és víz 1:5 arányú keveréke).

A mérést úgy végeztük el, hogy 1 ml desztillált vízben kb. 2-100 µg fehérje legyen, ezért 900 µl desztillált vízhez adtunk 100 µl-t a feltárt mintából, majd ezt a 10-szeresére hígítottuk. Ehhez az oldathoz 1 ml A-reagenst adtunk, vortexeltük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 0,5 ml B-reagenst adtunk az elegyhez, vortexeltük és újra szobahőmérsékleten inkubáltuk 20 percig.

Miután letelt a 20 perc, fotométerrel 750 nm-en mértük le a minták abszorbanciáját. Minden mintából, valamint a két fehérjét nem tartalmazó referencia oldatból is 3 párhuzamos mérést készítettünk. Kalibrációs oldatot bovin szérum albuminból (BSA) készítettünk: 10 ml 0,5 mg ml⁻¹ koncentrációjú BSA oldatot úgy hígítottuk fel, hogy 1 ml desztillált vízben 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 125 µg fehérje legyen (Peterson, 1983).

V.17. A ZEA-GSH és PAT-GSH közötti interakció

A ZEA valamint a PAT és a GSH közötti esetlegesen fennálló interakció vizsgálatához 1 mM ZEA ill. 1mM PAT és 10 mM GSH tözsoldatot készítettünk, foszfát pufferben (pH 8) hígítottuk, megfelelő arányban küvettában összemértük, és a fluoreszcens szignált detektáltuk. A GSH-koncentrációt végig állandó értéken tartottuk (100 µM), és 0, 10, 30, 70, 90, 110, 130, illetve 170 µM ZEA-t illetve PAT-t adtunk hozzá. Fluorolog τ3 spektrofluorométer (Jobin- Yvon/SPEX, Longjumeau, France) segítségével vettük fel a fotolumineszcens spektrumokat 0,2 s-os integrációs időt beállítva. Az excitációs és emissziós résszélesség 1 nm volt. A belső-szűrő hatásának kizárása érdekében right angle detektálási módot választottunk. A GSH fluoreszcencia-intenzitás változásait 315 nm-es excitációs hullámhosszon vizsgáltuk ZEA illetve PAT jelenlétében és hiányában. Az adatok elemzéséhez DataMax 2.20 (Jobin-Yvon, Longjumeau) és HypeQuad (Protonic Software) programokat használtunk. A kapott eredmények validálására intenzitás-független fluoreszcens polarizációs vizsgálatot végeztünk. Ehhez 10 µM GSH-t vizsgáltunk 10 µM ZEA illetve PAT jelenlétében és hiányában. A GSH polarizációs fokváltozásait detektáltuk 315 nm excitációs és 420 nm emissziós hullámhosszon.

V.18. G2/M fázisblokk vizsgálata

Közép-logaritmikus fázisú tenyészetet centrifugáltunk, mostunk és a sejteket SM+ura tápoldatban vettük fel. A sejtszámot 10⁷ db sejt ml⁻¹-re állítottuk be. 1 ml tenyészeteket kezeltünk 500 µM ZEA-val 1 órán át, illetve a kontrollhoz megegyező térfogatban az oldószerként használt etanolt 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 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 ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$) (Sabatino és Forsburg, 2009).

V.19. Sejtmag-morfológiai vizsgálatok

A sejtmagok morfológiai változásainak kimutatásához a sejtmagokat DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) fluoreszcens festékkel jelöltük és epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A DAPI fluoreszcens jelölő, amely a duplaszálú DNS-hez kötődik. Abszorpciós maximuma 358 nm, emissziós maximuma 461 nm, kék fluoreszcenciát mutat.

Középlög tenyészetből származó sejteket centrifugáltunk, mostunk és vettünk fel SM+ura tápoldatban. A sejtszámot 10^8 db sejt ml^{-1} -re állítottuk be. A sejteket 60 percig kezeltük meghatározott ZEA koncentrációkkal (0 μM , 500 μM , 1000 μM). 4-5 μl sejtszuszpenziót szétoszlattunk tárgylemezen, majd beszáradás után 3 μl DAPI festékkel (10 $\mu\text{g/ml}$) festettük, és fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse 80i, UV szűrővel) vizsgáltuk a sejteket, majd fotókat készítettünk. Kezelésenként legalább 300 sejtet vizsgáltunk.

A PAT esetében is ugyanezt a protokollt alkalmaztuk, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a sejteket 90 percig kezeltük 50 μM illetve 500 μM PAT-tal.

V.20. Az apoptózis és a nekrosis vizsgálata

Középlogaritmikus fázisú tenyészetből centrifugálás és mosás után 10^7 ml^{-1} protoplasztot kezeltünk 500 és 1000 μM ZEA-val 90 percen keresztül 1,2 M szorbitol-pufferben. 3 mM H_2O_2 -dal kezelt protoplasztokat használtunk pozitív kontrollként (Madeo és mtsai., 1999). Ezután a protoplasztokat a Vybrant apoptosis assay kit #2 (Molecular Probes[®]) protokolljának megfelelően kezeltük. Az apoptotikus sejteket Annexin-V, a nekrotikus sejteket PI festékkel festettük, a jelölt sejteket BD FACS Calibur áramlási

citométerrel detektáltuk FL1 ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$) csatornán keresztül (Laun és mtsai., 2001).

V.21. Az össz-szterin-tartalom meghatározása gázkromatográfiával

A ZEA növekedésifázis-eltoló hatása miatt az 500 μM ZEA-val kezelt tenyészeteket 50, míg a kontroll tenyészeteket 36 órán át tenyésztettük 30 °C-on, 150 fordulat perc^{-1} -en. Így mindegyik tenyészet stacioner fázisba került. 10 ml, 2×10^7 sejt ml^{-1} sejtszámú tenyészeteket mostunk és centrifugáltunk. A teljes szterin-tartalmat a lipidek 1 órás, 85 °C-on végzett hidrolízisével nyertük, melyhez 3 ml alkoholos KOH-oldatot (25%) használtunk. A szterinek elválasztásához 1 ml desztillált víz és 3 ml *n*-heptán keverékét alkalmaztuk, 3 perces vortexes keverést alkalmazva. A heptán réteget alkalmaztuk a vizsgálathoz. A szterinek analízisét gázkromatográfiával (GC-6890 N, Agilent Technologies) végeztük, HP-5 kapilláris-oszlopot (30 m \times 0,32 mm, film vastagság 0,25 μm ; Agilent Technologies) és FID detektort (konstans áramlás, hidrogén 30 ml min^{-1} , levegő 500 ml min^{-1} , 250 °C) alkalmazva, hőmérsékleti gradiens mellett (280 °C 1 percig, 280-290 °C 5 °C min^{-1} emelkedéssel, 290 °C 22 percig, 290-310 °C 20 °C min^{-1} emelkedéssel, 310 °C 2 percig) hidrogént használva vivőgázként (áramlás 2,5 ml min^{-1} , sebesség 40 cm s^{-1} , nyomás 220 kPa) 1:50 megosztási aránnyal (300 °C, hidrogén-áramlás 51 ml min^{-1} 2 percig, aztán 20 ml min^{-1} , 220 kPa nyomáson). A kapott szterincsúcsok azonosítása különböző szterin-standardok összehasonlítása alapján történt ChemStation B0103 program (Agilent Technologies) segítségével. Az ismeretlen csúcsok azonosítására a szterinek GC-MS vizsgálatát is elvégeztük. A mintákat gázkromatográfba vezettük majd elválasztottuk egy tömegszelektív detektor (MS-5975, Agilent Technologies) segítségével (feszültség 70 eV). A csúcsok MSD ChemStation E.00.00.202 (Agilent Technologies) segítségével lettek elválasztva, kombinálva NIST Mass Spectral Search Program 2.0-val (Agilent Technologies) (Kálmán és mtsai., 2013).

V.22. Statisztikai analízis

Az eredmények legalább három független kísérletből és annak három technikai ismétléséből származnak. Az átlag \pm érték a szórást, és nem a standard hibát jelöli. Ahol nincs megadva szórás érték, ott reprezentatív eredményekről van szó, ahol a szórás nem nagyobb, mint 15%.

VI. Eredmények

VI.1. Az ösztrogén receptor analógia vizsgálata

Összehasonlítva a *S. pombe* genomját a humán β -ösztrogén receptor (ESR2) nukleotid szekvenciájával, nem kaptunk homológ szekvenciát. A fehérje szintű összehasonlítás során három alacsony homológiát kaptunk (1. táblázat), melynek oka a hasonló fehérje-motívumokban keresendő.

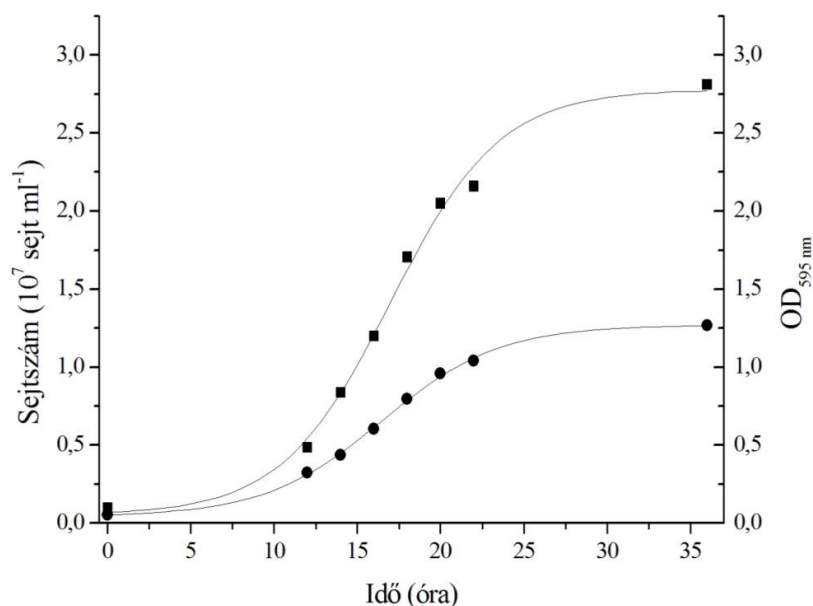
<i>S. pombe</i> fehérje neve	Fehérje leírása	Funkciója	Humán homológ	Funkciója	Egyezés mértéke
SPBC25H2.11c	SAGA komplex bromodomain Spt7 alegység	Transzkripciós koaktivátor fehérje alegysége, feladata a komplex összetartása (Wu és Winston, 2002)	Humán Hiszton acetiltranszferáz KAT2A	Transzkripciós aktivátor fehérje (5. webhely)	29%
SPCC613.08	feltételezhető CDK regulátor	A riboszóma exportban játszik szerepet a sejtciklus kontrollja során (6. webhely)	humán BCCIP - Izoamil acetát-hidrolizáló észteráz és kapcsolódó enzimek	A CDK2 aktivitásának gátlása sejtciklus blokk során (7. webhely)	26%
SPCC4G3.07c	PHD finger tartalmú Phf1 fehérje	Hiszton metilációt közvetít (Shi és mtsai., 2007)	human Polikomb-like PHD Zn-finger fehérje	Transzkripcionális szabályzók, amelyek a kromatinstruktúrát befolyásolják (8. webhely)	26%

1. táblázat. A *S. pombe* genom fehérje szintű összehasonlításának eredménye az alacsony homológájú fehérjék megnevezésével és funkcióik összehasonlításával.

A *C. albicans*ban található ösztrogén-kötő fehérjével összehasonlítva a *S. pombe* genomját, nukleotid szinten nem kaptunk egyezést, fehérje szinten is csak 33%-os egyezést kaptunk a *S. pombe* NADPH dehidrogenázával.

VI.2. Növekedési görbe felvétele és a generációs idő meghatározása

A törzs általános jellemzéséhez meghatároztuk annak szaporodáskinetikáját és generációs idejét SM tápoldatban. Méréseink alapján a sejtek a közép-logaritmikus fázist 16 óra elteltével érik el (7. ábra). Generációs idejük 3,5 óra.



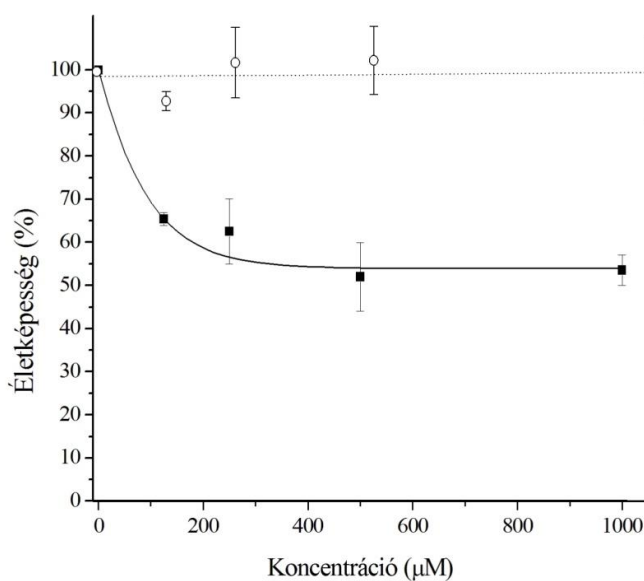
7. ábra. A *S. pombe* növekedési görbéje sejtszám (■) és OD_{595} (●) alapján.

VI.3. A ZEA-val végzett kísérletek eredményei

VI.3.1. A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása

VI.3.1.1. A MIC_{50} értékének meghatározása

Standard mikrodilúciós módszerrel meghatározva a minimális gátló koncentrációt, azt tapasztaltuk, hogy a ZEA nem lineáris, de koncentráció-függő sejtpusztulást idéz elő 500 μM -os koncentrációig (8. ábra). Ezek alapján a ZEA MIC_{50} értéke (az a minimális koncentráció, amely 50%-os növekedés-gátlást eredményez) 500 μM -nak adódott, ezért a többi kísérletünkben ezt a koncentrációt alkalmaztuk.



8. ábra. A ZEA(■) MIC_{50} és β -ösztadiol (○) MIC értékének meghatározása 48 órás kezelés után standard mikrodilúciós módszerrel.

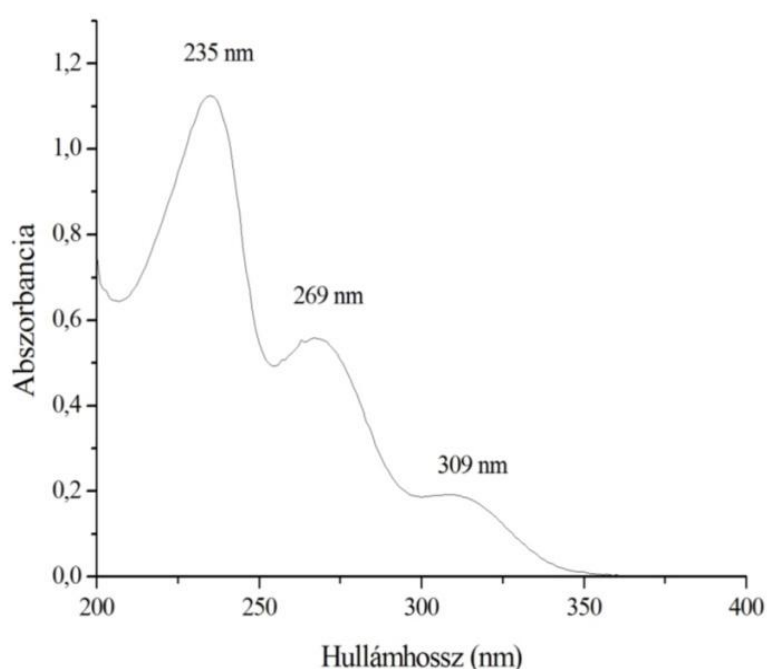
VI.3.1.2. A β -ösztradiol MIC-nek meghatározása

Bár a *S. pombe* nem rendelkezik ösztrogén receptorral, vagy azzal analóg fehérjével, fontosnak tűnt megvizsgálni a β -ösztradiol sejtekre kifejtett hatását. A β -ösztradiol 1480 μ M-os koncentrációig nem mutatott növekedésgátló, vagy a szaporodást egyéb módon befolyásoló hatást (8. ábra).

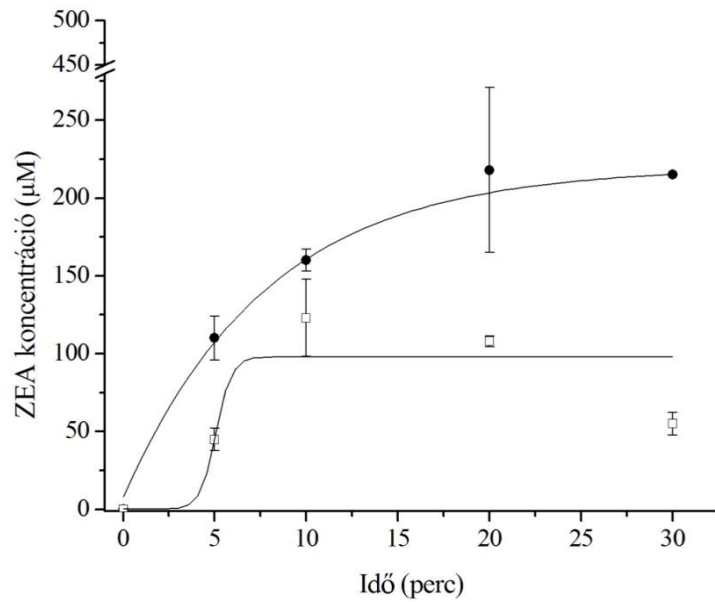
VI.3.2. Felvétel-kinetika

Ahhoz, hogy a sejtek által felvett toxin koncentrációja megállapítható legyen, először a ZEA abszorpciós spektrumát határoztuk meg (9. ábra). A vegetatív sejteket és a sejtfall nélküli protoplasztokat 0,6 M-os, ozmotikusan stabil KCl-oldatban kezeltük 500 μ M ZEA-val. Ez a koncentráció nem okoz protoplaszt-lízist vagy zsugorodást. A sejteket centrifugáltuk, a felülúszót 269 nm-en fotometráltuk és a kalibrációs görbe alapján meghatároztuk a sejtek által felvett ZEA koncentrációját.

A protoplasztok 6 perc alatt elérték a telítődési maximumot, mely idő alatt a toxin 20%-át vették fel (10. ábra). A vegetatív sejtek esetében a telítődés 25 perc után következik be, a felvett toxin pedig a kezdeti mennyiség 40%-a.



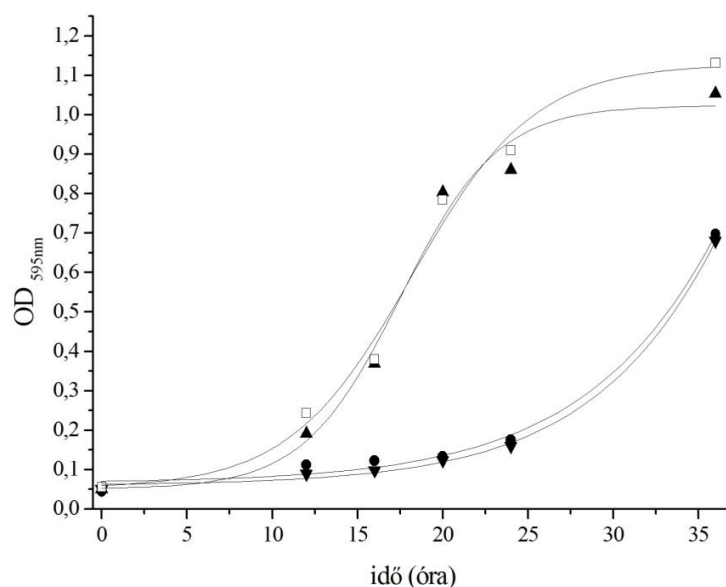
9. ábra. A ZEA abszorpciós spektruma.



10. ábra. A vegetatív sejtek (●) és a protoplasztok (□) által felvett ZEA mennyisége.

VI.3.3. A szaporodásgátlás meghatározása

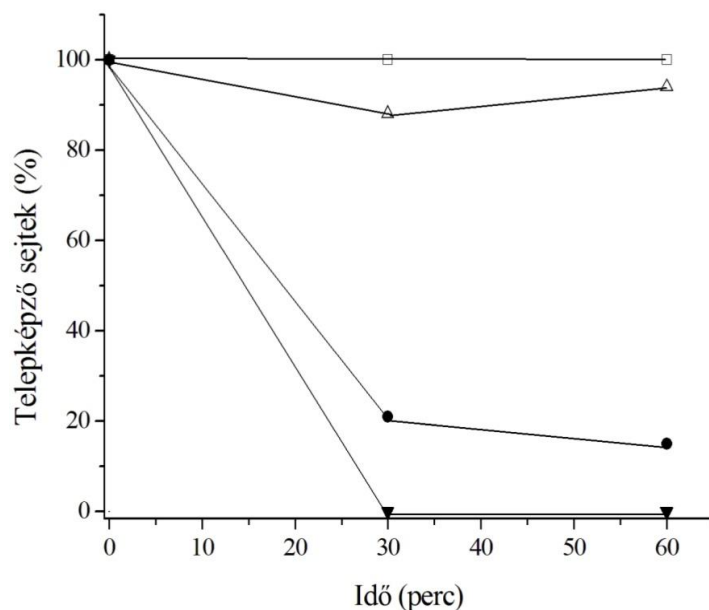
A következő lépésben meghatároztuk a ZEA élesztő sejtekre gyakorolt szaporodásgátló hatását (11. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy 20 órás inkubálás után a 100 µM-os ZEA-kezelés nem okozott jelentős gátló hatást. Az 500 és 1000 µM-os kezelés hatására azonban a sejtek növekedése 83%-ban gátlódott a 20 órás tenyészetben, amely hatás mértéke 36 óra elteltével 38%-ra csökkent. A kezelés miatt a sejtek növekedési fázisa eltolódott, mert a kezelt sejtek 8 órával később érték el a közép-logaritmikus fázist. A kezelt sejtek generációs ideje az első 20 órában 12,78 órának adódott, míg a 20. óra után negyedére, 4,3 órára csökkent.



11. ábra. A ZEA különböző koncentrációinak szaporodásgátló hatása hasadó élesztőre (□: kontroll, ▲: 100 µM, ●: 500 µM, ▼: 1000 µM).

VI.3.4. Pusztítási görbe felvétele

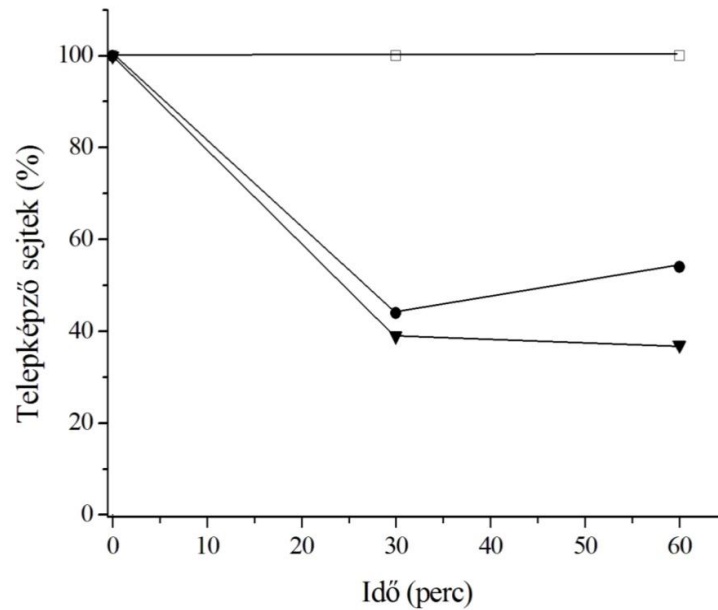
A pusztítási görbe felvételéhez SM+ura tápoldatban kezeltük a sejteket és koncentráció-függő sejtpusztulást tapasztaltunk (12. ábra). A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, melynél a telepképző sejtek számát 100%-nak vettük, 500 μM -nál a sejtek 85%-a, míg 1000 μM -nál a 100%-a elvesztette szaporodási képességét. Meghatároztuk a teljes gátló-koncentráció alatti koncentrációt (szubinhibitor koncentráció), amely esetben a sejtek legalább 80%-a megtartotta szaporodó-képességét. Ez 250 μM -nak adódott.



12. ábra. A telepképzésre képes sejtek százaléka különböző koncentrációjú ZEA kezelés hatására (□: kontroll, Δ: 250 μM , ●: 500 μM , ▼: 1000 μM).

VI.3.5. Az adaptáció vizsgálata

A szaporodásgátlás során tapasztalt, kezelés hatására bekövetkező elhúzódó logaritmusikus fázis a sejtek adaptációját feltételezte a toxinnal szemben. A pusztítási görbe segítségével meghatározott szubinhibitor koncentrációval (250 μM) történő egy órás előkezelés hatására nőtt a sejtek túlélőképessége (13. ábra), mert 60 perces, 500 és 1000 μM -os kezelést követően a sejtek 50%-a illetve 38%-a élt túl.

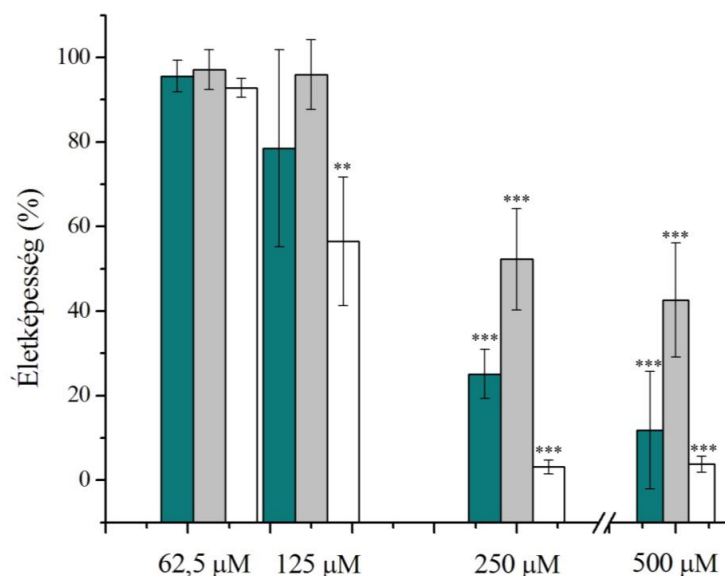


13. ábra. A telepképzésre képes sejtek százaléka 1 órás 250 μM-os ZEA előkezelést követő újabb ZEA kezelés után (□: kontroll, ●: 500 μM, ▼: 1000 μM).

VI.3.6. Az oxidatív stressz-folyamatok szabályzásának vizsgálata *S. pombe* deléciós mutáns törzseken

A *S. pombe* esetén a külső oxidatív stresszre adott válaszok, így a ZEA hatására megemelkedő H_2O_2 és $O_2^{\cdot-}$ szinttel szembeni adaptációs folyamatok különböző jelátviteli útvonalakon keresztül szabályzódnak. Ahhoz, hogy meghatározzuk, hogy mely útvonalak vesznek részt az adaptációs folyamatokban, meghatároztuk a ZEA szaporodásgátló hatását az *S. pombe* szülői törzsön és két transzkripciós faktorban – a MAPK kaskád Atf1 transzkripciós faktorában, illetve a kaskádtól független Pap1 transzkripciós faktorban - deléciós mutáns törzsön. Alacsony koncentrációnál (62,5 μM) a ZEA nem okozott szignifikáns csökkenést egyetlen törzs túlélésében sem a saját, kezeletlen kontrolljaikhoz viszonyítva, azonban 125 μM ZEA 40%-kal csökkentette a Pap1 transzkripciós faktorban deléciós mutáns törzs életképességét (14. ábra). Magasabb koncentrációknál (250-500 μM) a legjelentősebb a $\Delta pap1$ törzs érintettsége, de ezeknél a koncentrációknál a $\Delta atf1$ életképessége is jelentősen csökkent (14. ábra).

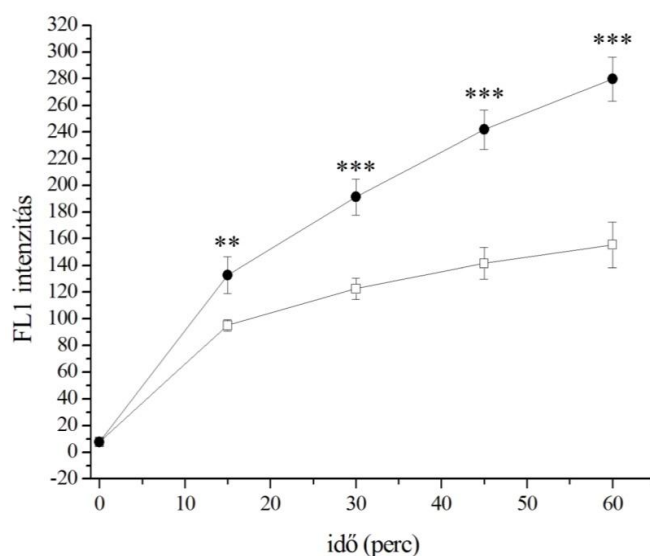
Mindezek az eredmények azt jelzik, hogy a ZEA-indukált oxidatív stressz szabályzásában a fő szerepet az alacsony oxidatív stresszre reagáló - MAPK úttól függetlenül reguláló - Pap1 transzkripciós faktor játssza, azonban az Atf1 érintettsége azt jelzi, hogy a speciális szabályzásban a MAPK útvonal is részt vesz.



14. ábra. *S. pombe* szülői törzsének (■), $\Delta atf1$ (▣) és $\Delta pap1$ (□) deléciós mutánsainak az életképessége (%) különböző ZEA koncentrációk jelenlétében standard mikrodilúciós módszerrel meghatározva. ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$. p értékek a Student t -teszt alapján számolva.

VI.3.7. Az intracelluláris peroxid-koncentráció

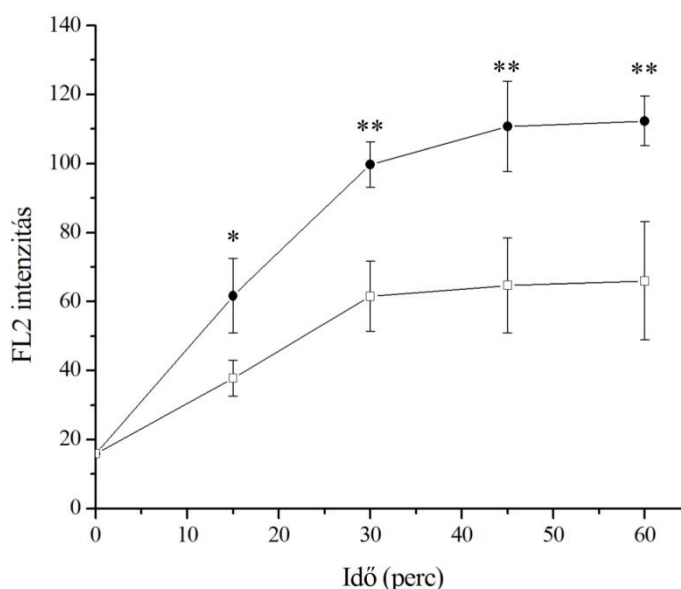
Következő lépésként az intracelluláris peroxid-koncentráció változásait határoztuk meg az idő függvényében. Ehhez a dihidrorodamin 123 peroxid hatására bekövetkező oxidálódását mértük, amely reakció során fluoreszkáló rodamin keletkezik. A keletkező rodamin fluoreszcencia-intenzitása arányos a peroxidok koncentrációjával. Ezt a fluoreszcens jel intenzitás-változást detektáltuk áramlási citométer alkalmazásával. 500 μM ZEA hatására szignifikánsan, 1,8-szeresére növekedett a H_2O_2 -koncentráció a sejtekben 60 perc után a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (15. ábra).



15. ábra. Az intracelluláris H_2O_2 koncentrációjának megfelelő fluoreszcens intenzitás változása az idő függvényében (□: kontroll; ●: 500 μM ZEA). ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$. p értékek a Student t -teszt alapján számolva.

VI.3.8. Az intracelluláris szuperoxid-koncentráció

A O_2^- mennyiségi változásának meghatározásához a dihidroetidium etidiummá való oxidációját használtuk fel. A keletkező etidium fluoreszcencia-intenzitása ebben az esetben is arányos a O_2^- gyök koncentrációjával. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy 60 perc elteltével a ZEA-val kezelt sejtekben a O_2^- gyök koncentrációja a kétszeresére emelkedett a kontrolléhoz viszonyítva (16. ábra).



16. ábra. Az intracelluláris O_2^- koncentrációjának megfelelő fluoreszcens intenzitás változása az idő függvényében (□: kontroll; ●: 500 μ M ZEA). * $p < 5\%$; ** $p < 1\%$ p értékek a Student t -teszt alapján számolva.

VI.3.9. A hidroxilgyök koncentrációjának meghatározása

Elektron spin rezonancia (EPR) spektroszkópia módszerét alkalmazva meghatároztuk a sejtek Cr(VI) redukáló képességének mértékét, valamint PBN gyökfogó molekulával az intracelluláris hidroxilgyök koncentrációját. A $K_2Cr_2O_7$ hozzáadása után a $\bullet OH$ koncentrációja ugyan emelkedett, de nem szignifikánsan (2. táblázat). A Cr(VI) redukáló képesség információkat szolgáltat a sejt oxidoredukációs egyensúlyáról, illetve annak változásáról, azonban a redukciós kapacitásban sem mutattunk ki szignifikáns különbséget (2. táblázat).

	Kettős integrál $\times 10^8$ mg^{-1} fehérje			
	Kontroll $\bullet OH$	Kezelt $\bullet OH$	Kontroll Cr(V)	Kezelt Cr(V)
PBN + Cr(VI)	$8,7 \pm 1,8$	$11,3 \pm 1,05$	$170,4 \pm 8,64$	$193,8 \pm 27,7$

2. táblázat. A PBN-OH és a Cr(V) koncentrációi 500 μ M ZEA kezelés hatására *S. pombe* feltárt sejteken.) * $p < 5\%$; ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$. p értékek a Student t -teszt alapján számolva.

VI.3.10. Az antioxidáns védekező rendszer változásai

Egy órás, 500 μM -os ZEA-kezelés hatására 3-szoros és 4-szeres csökkenés következett be a GSH és GSSG mennyiségében a kontrollhoz képest. Szignifikánsan megnőtt az össz-SOD, a CuZn SOD, a CAT, a GR és a GST specifikus aktivitása, míg a GPx és a G6PD aktivitása szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest (3. táblázat).

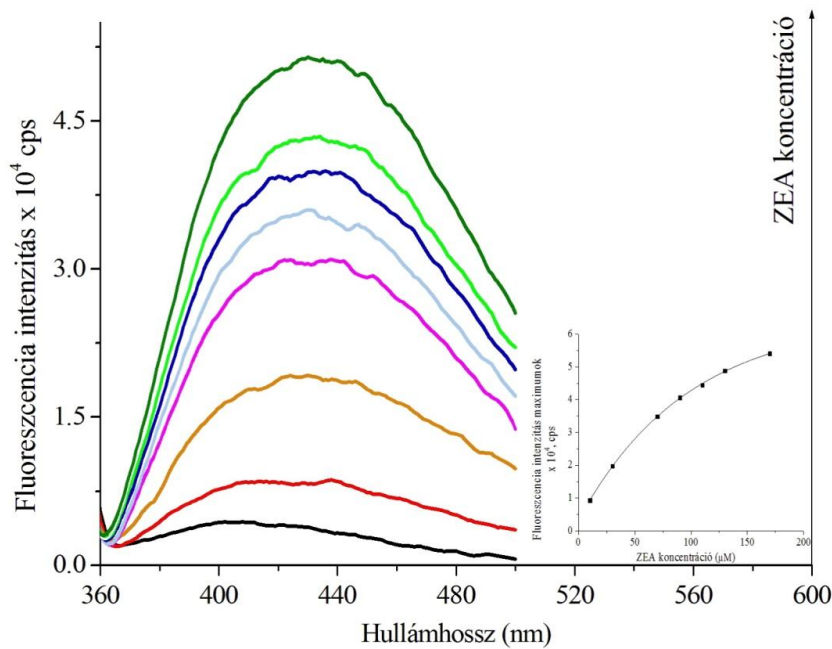
	Kontroll	500 μM ZEA
GSH ^a	9,93 \pm 0,93	2,93 \pm 1,03 ***
GSSG ^a	0,32 \pm 0,02	0,07 \pm 0,05 ***
GSH/GSSG	31,44	43,102
SOD-ok ^b	18,23 \pm 1,52	22,13 \pm 1,78 **
CuZnSOD ^b	16,86 \pm 1,13	21,26 \pm 1,55
MnSOD ^b	1,37 \pm 0,42	0,87 \pm 0,24
CAT ^c	13,24 \pm 1,55	19,34 \pm 2,26 **
GPx ^d	1,38 \pm 0,12	0,47 \pm 0,31 **
GR ^d	39,99 \pm 5,66	61,89 \pm 13,78*
G6PD ^d	177,39 \pm 17,97	140,60 \pm 5,32 *
GST ^d	6,37 \pm 2,39	10,33 \pm 0,72 **

3. táblázat. *S. pombe* kontroll és 500 μM ZEA-val kezelt sejtjeinek specifikus GSH és GSSG koncentrációja, valamint a specifikus SOD, CAT, GST, GR, GPX és G6PD aktivitása 60 perces kezelés után (átlag \pm szórás-ként megjelenítve) * $p < 5\%$; ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$. p értékek a Student t -teszt alapján számolva.

^a A specifikus koncentráció μM (mg fehérje)⁻¹-ben megadva; ^b A specifikus aktivitás unit (min (fehérje)⁻¹-ben megadva; ^c A specifikus aktivitás μM (min (mg fehérje)⁻¹-ben megadva; ^d A specifikus aktivitás nM (min mg fehérje)⁻¹-ben megadva.

VI.3.11. A ZEA és a GSH közötti interakció

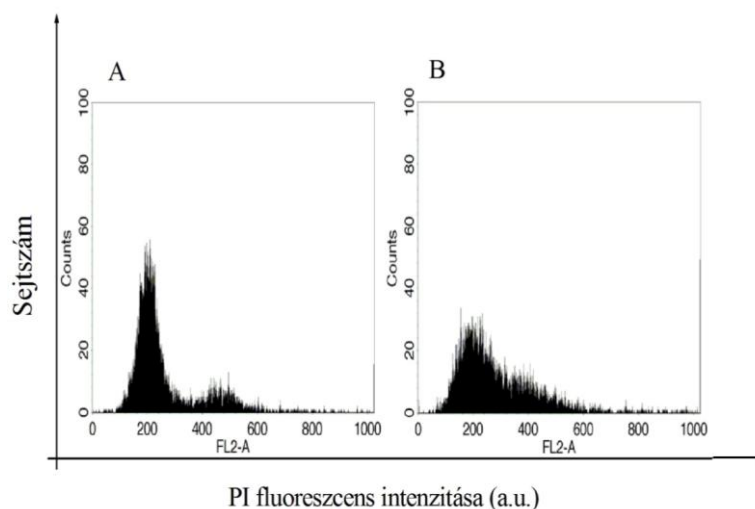
ZEA jelenlétében a GSH fotolumineszcens szignálja szignifikánsan megváltozott. Az adatok elemzése után azonban kiderült, hogy ez a változás a belső-szűrő hatás miatt alakult ki, nem pedig a kölcsönhatás megléte miatt (17. ábra). Az eredmény validálása érdekében megvizsgáltuk a jelenséget intenzitás-független, fluoreszcens polarizációs módszerrel. Az eredmények a GSH szinte teljes depolarizált emisszióját mutatták (polarizációs fok: $3,2 \pm 1,5\%$) ZEA jelenlétében és hiányában is, amely adott molekuláris környezetben a GSH és a ZEA közötti kölcsönhatás hiányát mutatja.



17. ábra. A GSH fotolumineszcens spektruma különböző koncentrációjú ZEA oldatok jelenlétében (■: 0 μM ; ■: 10 μM ; ■: 30 μM ; ■: 70 μM ; ■: 90 μM ; ■: 110 μM ; ■: 130 μM ; ■: 170 μM). Belső ábra: A fotolumineszcens spektrumok intenzitásmaximumai növekvő ZEA koncentráció mellett (cps – counts per second)

VI.3.12. A G2/M fázisblokk vizsgálata

Egy órás, 500 μM -os ZEA-kezelést követően áramlási citometriás mérés segítségével vizsgáltuk a sejtek DNS-tartalmát, ezáltal a sejtciklus különböző fázisában való tartózkodásukat. Szignifikánsan lecsökkent a G1 fázisban található sejtek aránya. Míg a kontroll sejtek $79 \pm 2,11\%$ -a volt G1 fázisban, a kezelt sejteknél ez az arány $63,41 \pm 3,44\%$ volt. Ezzel szemben a G2/M fázisban tartózkodó sejtek aránya $21,24 \pm 0,84\%$ -ról $31,92 \pm 3,39\%$ -ra nőtt, mely növekedés szintén szignifikáns (18. ábra).



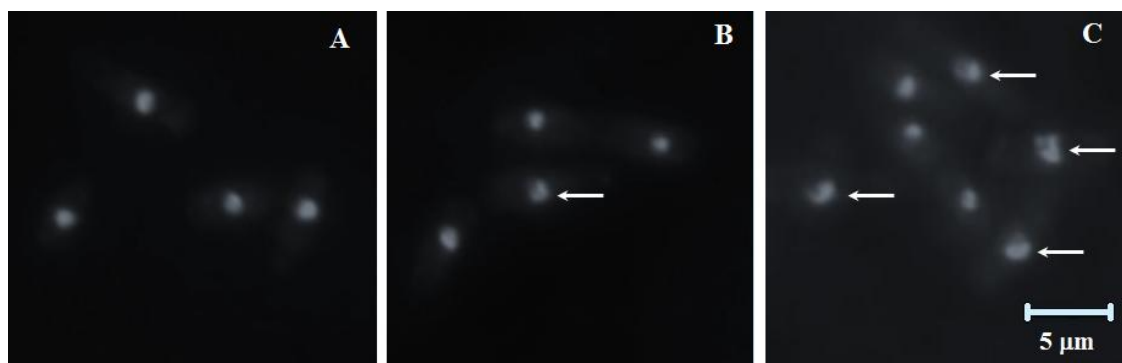
18. ábra. A ZEA sejtciklusra gyakorolt hatása 60 perces kezelés után. A *S. pombe* kontroll (A) és 500 μM ZEA-val (B) kezelt sejtek DNS tartalmának áramlási citometriás vizsgálata FL2-A detektorral.

VI.3.13. Sejtmag-morfológiai változások

A sejtciklus blokkja felveti a DNS sérülésének, ezáltal a sejtmag morfológiai változásának a lehetőségét. Ennek bizonyítására vizsgáltuk a ZEA hatására bekövetkező, a sejtciklus különböző szakaszaiban jellemző sejtmag-morfológiától való eltéréseket. Az eredmények értékelése során a CCD kamerával rögzített fotók alapján számszerűsítettük a sejtciklus különböző szakaszaiban jellemző sejtmag-morfológiától való eltéréseket.

Azt tapasztaltuk, hogy ZEA-kezelés hatására – összehasonlítva a kezeletlen mintákban tapasztalt ép sejtmagvú sejtekkel (19. A ábra) – a sejtmagok alakja számos esetben szabálytalan lett, vagy fragmentálódott (19. B. és C. ábra).

A megváltozott sejtmagalakú sejtek számában koncentráció-függő emelkedést tapasztaltunk 60 perces kezelést követően (19. B és C ábra). A kontroll mintával összehasonlítva, 500 μM kezelés hatására 1,1-szeresére, míg 1000 μM esetében 1,26-szorosára emelkedett a megváltozott sejtmagú sejtek aránya. Mintánként átlagosan 500 sejtmagot vizsgáltunk meg.



19. ábra. ZEA-indukált sejtmag-fragmentáció *S. pombe* kontroll (A), 500 μM (B), és 1000 μM (C) ZEA kezelt sejtjeiben 1 óra után.

VI.3.14. Az apoptózis és a nekrozis vizsgálata

Normál, élő sejtekben a foszfatidil-szerin a sejtmembránban a citoplazmikus felszín felé helyeződik. Apoptotikus sejtekben a foszfatidil-szerin áthelyeződik a membrán felszínére, amelyhez az Annexin-V festék nagy affinitással kötődik. A PI az élő és apoptotikus sejt számára nem átjárható, de a nekrotikus, elpusztult sejteket vörös fluoreszcensen jelöli úgy, hogy közvetlenül a nukleinsavhoz kötődik. 90 perces 500 és 1000 μM -os ZEA-kezelés után vizsgáltuk az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát, azonban sem apoptózist, sem nekrozist nem mutattunk ki, még a H_2O_2 -dal kezelt kontrollnál sem.

VI.3.15. Az össz-szterin-tartalom változása

A β -ösztradiollal mutatott szerkezeti hasonlósága miatt felmerült annak a lehetősége, hogy a ZEA hatással van a szterin-bioszintézisre, befolyásolja enzimeinek működését. Ezért korai stacioner fázisú tenyészeteken vizsgáltuk a ZEA szterin-összetételre gyakorolt hatását. A kontroll esetében 36 órás tenyészettel, míg az 500 μ M ZEA-val kezelt minta esetében 50 órás tenyészettel dolgoztunk a toxin szaporodást gátló, sejtciklus eltoló hatása miatt. A kontrollhoz viszonyítva szignifikáns, kvantitatív változásokat tapasztaltunk a kezelt minta szterin-összetételében. Az élesztők esetében a szterin-bioszintézis végterméke az ergoszterin, melynek mennyisége 1,1-szeresére növekedett. A köztitermékek mennyiségében is szignifikáns különbségek mutatkoztak; a fekoszterin mennyisége 1,74-szorosára növekedett, míg a szkvalén mennyisége negyedére csökkent, ahogy a 24-metilén-24,25-dihidrolanoszterin mennyisége is 27%-os csökkenést mutatott (4. táblázat).

Szterinek	Kontroll	500 μ M ZEA
Szkvalén	2,07 \pm 0,41	0,51 \pm 0,18 ***
Zimoszterin	0,84 \pm 0,45	0,28 \pm 0,14
Ergoszterin	63,69 \pm 3,33	70,31 \pm 2,88 *
Fekoszterin	3,13 \pm 0,50	5,45 \pm 1,08 **
Ergoszta-5,7-dienin ⁺	0,92 \pm 0,54	1,65 \pm 0,078
Episzterin ⁺	0,86 \pm 0,17	1,05 \pm 0,12
u.i.1	1,36 \pm 0,46	1,15 \pm 0,40
Lanoszterin	3,6 \pm 1,02	4,19 \pm 0,53
24-Metilén-24,25- dihidrolanoszterin	14,97 \pm 1,97	10,88 \pm 1,56 *
u.i.2	9,12 \pm 1,09	5,00 \pm 1,75 *

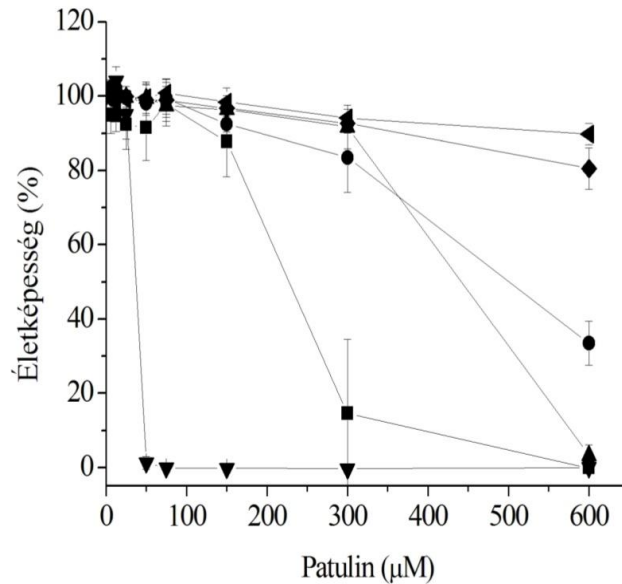
4. táblázat. Korai stacioner fázisú *S. pombe* kontroll és 500 μ M ZEA-val kezelt sejtjeinek szterin tartalma (%-ban megadva). * $p < 5\%$; ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$. p értékek a Student t -teszt alapján számolva. ⁺Feltételezett szterin komponens. Rövidítés: u.i. – azonosítatlan

VI.4.A PAT-tal végzett kísérletek eredményei

VI.4.1. Az oxidatív stressz-folyamatok szabályzásának vizsgálata *S. pombe* deléciós mutáns törzseken PAT-kezelés hatására

Előzetesen elvégzett kísérletek alapján már ismert volt, hogy a PAT oxidatív stresszt generál, és létezik sejtszintű adaptáció a toxinnal szemben. Ahhoz, hogy pontosan megállapítsuk, hogy a MAPK kaszkád mely elemei vesznek részt az adaptációban, a PAT szaporodásgátló hatását vizsgáltuk a *S. pombe* szülői törzsön és deléciós mutánsain ($\Delta wis1$, $\Delta atf1$, $\Delta sty1$, és $\Delta pap1$). A $\Delta pap1$ törzs bizonyult a legérzékenyebbnek, mert 50 μ M-os koncentrációban 98%-os gátlást szenvedett, míg 75 μ M teljes szaporodásgátlást idézett elő,

azonban ezek mellett a koncentrációk mellett a szülői törzs és a többi jelátviteli mutáns sejthozamában nem jelentkezett számottevő csökkenés (20. ábra).

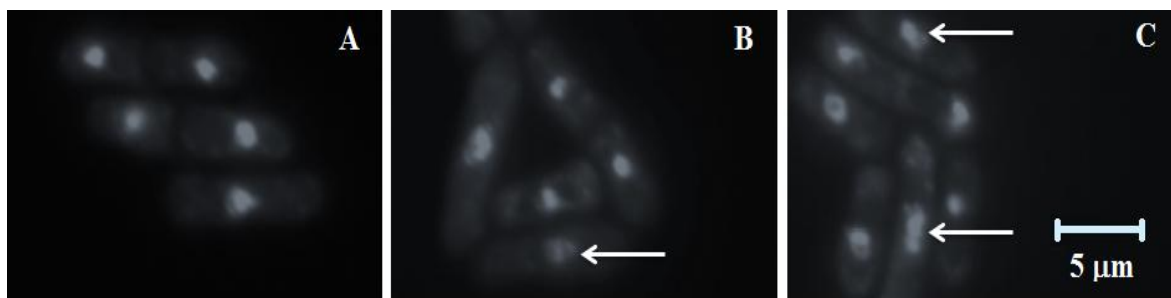


20. ábra. *S. pombe* szülői törzsének (♦), $\Delta wis1$ (■), $\Delta atf1$ (●), $\Delta sty1$ (▲) és $\Delta pap1$ (▼) deléciós mutánsainak az életképessége (%) különböző PAT koncentrációk jelenlétében standard mikrodilúciós módszerrel meghatározva.

600 µM PAT mindössze 10%-os csökkenést okoz a szülői törzs túlélésében, azonban a $\Delta wis1$, $\Delta sty1$ és $\Delta atf1$ mutánsok szaporodását 98, 95 illetve 65%-ban gátolta (20. ábra). Az eredmények alapján a MAPK útvonal több eleme is szerepet játszik a PAT-tal szemben kialakuló adaptáció mechanizmusában, azonban a MAPK útvonaltól független Pap1 transzkripciós faktor jelenléte elengedhetetlen a folyamathoz.

VI.4.2. Sejtmag-morfológiai változások

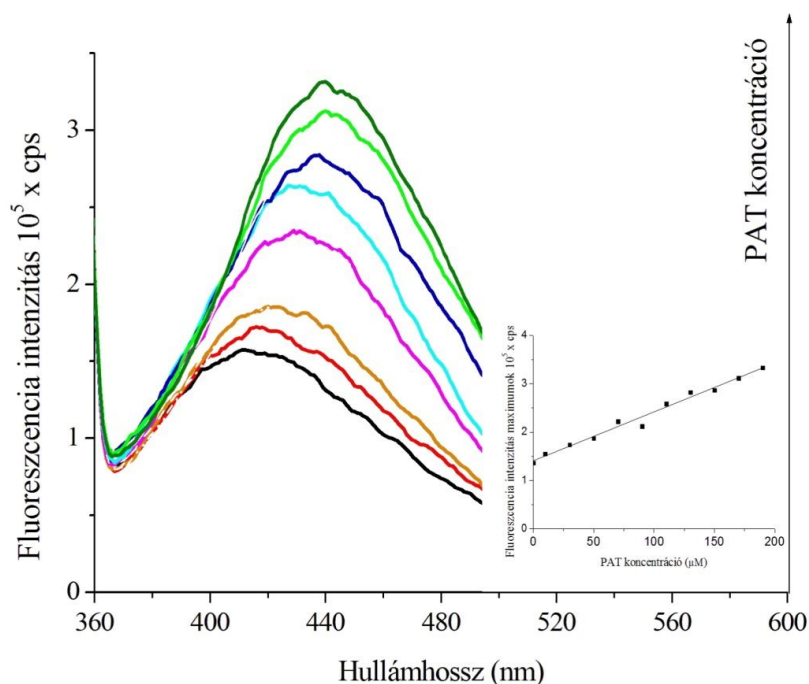
PAT-kezelés hatására a kontroll mintákban látható ép sejtmagú sejtekkel (21. A ábra) összehasonlítva, 90 perces kezelés után 50 µM PAT esetében 3,12-szeresére (21. B ábra), míg 500 µM PAT esetében 4,87-szeresére (21. C ábra) növekedett a megváltozott sejtmag-morfológiát mutató sejtek aránya.



21. ábra. PAT-indukált sejtmagfragmentáció *S. pombe* kontroll (A), 50 µM (B), és 500 µM (C) PAT kezelt sejteiben 90 perc után.

VI.4.3. A PAT és a GSH közötti interakció

A GSH fotolumineszcens szignál-változásai PAT növekvő koncentrációjú jelenléte mellett az interakció jelenlétét jelzik (23. ábra).



23. ábra. A GSH fotolumineszcens spektruma különböző koncentrációjú PAT oldatok jelenlétében (■: 0 μM ; ■: 10 μM ; ■: 30 μM ; ■: 70 μM ; ■: 90 μM ; ■: 110 μM ; ■: 130 μM ; ■: 170 μM). Belső ábra: A fotolumineszcens spektrumok intenzitásmaximumai növekvő PAT koncentráció mellett (cps – counts per second)

A kölcsönhatás igen erős 1:1 sztöchiometriai arány mellett, $\log K$ értéke 28. A kölcsönhatás meglétének igazolására polarizációs módszert alkalmaztunk. PAT jelenléte nélkül, a GSH fluoreszcens polarizációs foka önmagában $3 \pm 3 \%$, amely PAT jelenlétében $17 \pm 3 \%$ -ra emelkedik, megerősítve a kölcsönhatást a GSH és a PAT molekula között.

VII. Eredmények értékelése

VII.1. A *S. pombe* törzs általános jellemzése

A kísérleteinkhez használt *S. pombe* törzs általános jellemzésének első lépéseként megállapítottuk annak generációs idejét, amely 3,5 órának adódott (7. ábra). Standard mikrodilúciós módszer (NCCLS, 2002) segítségével meghatároztuk a ZEA minimális gátló koncentrációját a törzzsel szemben. Teljes gátlást nem tapasztaltunk, azonban a MIC₅₀ érték 500 µM volt (8. ábra), amely koncentrációt a további vizsgálatainkhoz alkalmaztunk.

A szakirodalomban legtöbbször a ZEA ösztrogén-specifikus hatásaival foglalkoznak (pl. McNutt és mtsai., 1928; Kuiper-Goodman és mtsai., 1987; Heneweer és mtsai., 2007; Zinedine és mtsai., 2007; Yazar és Omurtag, 2008), azonban kevés adat áll rendelkezésre bizonyítottan ösztrogén-analógiájától független károsító hatásairól. Ezért a munkánk során a *S. pombe*t olyan modellszervezetként alkalmaztuk, amely bizonyítottan nem tartalmaz a β-ösztrogén-receptorral analóg szekvenciát (< 29%), vagy a *Candida albicans* ösztrogén-kötő fehérjéjéhez hasonló szekvenciát (33%) sem nukleotid, sem fehérje szinten.

A β-ösztradiol minimális gátló koncentráció vizsgálatának eredménye szintén alátámasztja a receptor hiányát, hiszen kísérleteink alapján semmilyen növekedést befolyásoló hatást nem tapasztaltunk a *S. pombe* sejtekre.

VII.2. A ZEA citotoxikus hatása az *S. pombe*-ra

Kísérleteinket minden esetben (kivéve a MAPK-mutánsok MIC-ének meghatározása és a szterin-komponensek analízise) közép-logaritmikus fázisú sejteken végeztük SM tápoldatban azért, hogy a sejtek azonos fiziológiai állapotban legyenek, és hogy kiküszöböljük a komplett élesztőkivonat-tartalmú tápközeg antioxidáns hatását (Gazdag és mtsai., 2011a).

Viszonylag magas, 500 µM-os ZEA-koncentrációt alkalmaztunk az akut kezelések során, mivel - ahogy azt a felvétel-kinetika meghatározása során kimutattuk -, a sejtfalnak igen magas bioadszorpciós kapacitása van (10. ábra). A sejtfal nélküli protoplasztok a toxin 20%-át vették fel, míg a sejtfalú sejtek a 40%-át. A különbségből adódik, hogy a ténylegesen sejten belül ható toxinkoncentráció a kezdeti kezelési koncentrációnak mindössze kb. 20%-a (~100 µM). A protoplasztok felvétel-kinetikája azt sugallja, hogy bioakkumuláció helyett (pl. aktív transzport) diffúzió történik, amely párhuzamosan zajlik a bioadszorpcióval. Mindkét görbe telítődést mutat, amely arra utal, hogy nincs a felvétel sebességével összemérhető sebességű metabolizmus a sejten belül. A ZEA-val szerkezeti

analóg 17 β -ösztadiol is diffúzióval jut be a sejtmagba, ahol az ösztrogén-választ kiváltó elemekhez kapcsolódik (Metzler és mtsai., 2010).

A *S. cerevisiae* sejtfalának is van ZEA-adszorpciós kapacitása. Hidrogén- és Van Der Waals kötések kialakításával képes a sejtfal β -D-glükánja megkötni a ZEA-t, az adszorpció mértéke pedig egyenesen arányos a sejtfal β -D-glükán tartalmával (Yiannokouris és mtsai., 2004). *In vitro* kísérletben kimutatták, hogy a *S. cerevisiae* sejtfalából tisztított β -D-glükán a ZEA 88%-át adszorbeálja (Sabater-Vilar és mtsai., 2007).

ZEA-kezelés hatására koncentráció-függő szaporodásgátlást tapasztaltunk (11. ábra), amely gátlás 36 óra elteltével jelentősen mérséklődött. A sejtek koncentráció-függő növekedés-gátlását tapasztalták több esetben is különböző emlős sejtvonalakon (pl. Arai és mtsai., 2000; Abid-Essefi és mtsai., 2004; Gazzah és mtsai., 2010) illetve *S. cerevisiae* élesztő sejteken (pl. Boeira és mtsai., 1999).

A sejtek generációs ideje megnövekedett, ezért 8 órával később léptek a közép-logaritmikus fázisba. A mérséklődő szaporodásgátló hatás egy esetleges adaptációs folyamatot feltételez a toxinnal szemben. Koncentráció-függő sejtpusztulást tapasztaltunk (12. ábra), azonban a sejteket egy órán át előkezelve az ún. szubinhibitor koncentrációval, jelentősen megemelkedett a telepképző sejtek száma 500 és 1000 μ M kezelést követően (13. ábra), amely emelkedés bizonyítja a ZEA-val szemben kialakult adaptációt. A ZEA-val szembeni sejtszintű adaptációs folyamatról az irodalom még nem számolt be. A *S. pombe* több más, oxidatív stressz-generáló ágenssel szemben is képes adaptálódni (Lee és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 1997). Ilyen jelenség figyelhető meg egy másik mikotoxin, a PAT esetében is (Horváth és mtsai., 2010), de a hasadó élesztő képes adaptálódni alacsony koncentrációjú, 0,2 mM H₂O₂-dal és menadionnal szemben is (Giga-Hama and Kumagai, 1997). A jelenség lényege, hogy a sejtekben kialakuló, mérsékelt stressz felkészíti a sejtet a későbbi, magasabb koncentrációban jelenlévő stresszorok által kiváltott nagyobb mértékű stresszel szemben, aktiválva a sejtek antioxidáns rendszerét. Az adaptáció kialakításában az aktiválódó, antioxidáns enzimek és nem enzimikus molekulák működnek közre.

VII.3. A ZEA oxidatív stressz-indukáló hatásának vizsgálata

Az oxidatív stresszorok elleni adaptáció kialakításában elengedhetetlen szerepe van a Pap1 transzkripciós faktornak, amely igen érzékeny az oxidatív stresszre (különösen a H₂O₂-ra) redox-szenzitív szenzora, a peroxiredoxin miatt (Vivacos és mtsai., 2006). Vizsgálataink során deléciós mutánsokat alkalmaztunk, amelyek közül a $\Delta pap1$ bizonyult a legérzékenyebbnek ZEA-kezelés hatására (14. ábra), így elmondhatjuk, hogy a

védekezésben szükséges gének expressziós változásaiért (pl. CAT, GR) és az adaptáció kialakításáért elsősorban a Pap1 transzkripció faktor a felelős. Azonban, bár kisebb mértékben, de ZEA-érzékenynek mutatkozott egy másik transzkripció faktor, a MAPK útvonal által aktivált Atf1 is (14. ábra).

Mivel a Pap1 és a MAPK útvonal egyidejű működése nem lehetséges (Vivacos és mtsai., 2006), a jelenségnek két magyarázata lehet. Egyrészt, mivel kísérleteinket deléciós mutánsokon végeztük, és nem génextpressziós szintet vizsgáltunk, a két, transzkripció faktorban deléciós mutáns törzs érintettsége adódhat a transzkripció faktorok hiányából. Másrészt, bár a két útvonal nem működhet egyidejűleg a különböző mértékű érzékenység (így a Pap1 inaktivációja) miatt, és aktivációjuk egymástól független, egy ponton a két útvonal mégis összekapcsolódik. A csökkenő stressz miatt a Pap1 ún. kései aktivációra is képes, amelyhez szükség van az Atf1-et foszforiláló Sty1 MAPK-ra. A Sty1 aktiválja a Srx szulfiredoxint, amely redukálja a peroxiredoxint, ezzel újra működőképessé téve a Pap1 útvonalat (Vivacos és mtsai., 2006). A kísérlet kiértékelése 48 óra után történt az NCCLS 2002-es szabványa szerint, így az adott időpillanat aktuális állapotáról ad információt.

Bár a ZEA-kezelés hatására bekövetkező össz-ROS emelkedést különböző sejtvonalakon már több alkalommal is kimutatták – makrofágokon (Yu és mtsai., 2011), HepG2 sejteken (Bouaziz és mtsai., 2008; Gazzah és mtsai., 2010), CHO-K1 sejteken (Ferrer és mtsai., 2009) – a különböző ROS-okat külön-külön (peroxidok, $O_2^- \cdot$, $\cdot OH$) még nem vizsgálták, pedig ezek keletkezése, biológiai aktivitása és detoxifikációja eltérő. Akut ZEA-kezelés hatására a sejtekben 1,8-szeresére növekedett a peroxidok (15. ábra), és kétszeresére a $O_2^- \cdot$ (16. ábra) mennyisége a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a ZEA megzavarja a mitokondriumok normális működését, amely a sejtek oxidoredukciós egyensúlyának felborulásához vezet.

Nem változott azonban szignifikánsan a $\cdot OH$ mennyisége és a sejtek redukciós kapacitása *in vitro* (2. táblázat). Bár vizsgálatainkat feltárt sejthomogenizátumokon végeztük, amely így egy mesterséges állapotot idéz elő, mégis információt kaphatunk a sejtek oxidoredukciós képességéről a $\cdot OH$ termelődött mennyisége és a Cr(VI) redukáló-képesség változásán keresztül.

Az emelkedett peroxid- és $O_2^- \cdot$ koncentrációra válaszol a sejt, mert megnövekszik az ezeket semlegesítő enzimek, a CAT és SOD specifikus aktivációja (3. táblázat). A SOD a szuperoxidot alakítja H_2O_2 -dá, amelyet a kataláz vízre és oxigénre bont. A tapasztaltakkal egyező jelenség figyelhető meg ZEA-val akutan kezelt Vero sejtvonalon a CAT esetében (Abid-Essefi és mtsai., 2012), valamint a CAT és a SOD esetében, szintén

akutan kezelt egerek veséjén (Boeira és mtsai., 2012). Akut H_2O_2 - és menadion-kezelés hatására szintén megnövekedett a SOD és CAT aktivitása a hasadó élesztő sejtekben (Giga-Hama és Kumagai, 2007). A SOD aktivitásának csökkenését mérték krónikus ZEA-kezelést követően sertések májában és vérsavójában (Jiang és mtsai., 1991), Wistar patkányok májában (Stadnik és mtsai., 2010) és hím Balb/c egerek heréjében (Salah-Abbès és mtsai., 2009). Azonban ezekben az esetekben feltételezhető, hogy a SOD és CAT aktivitásának csökkenése nem a ZEA-kezelés dierkt következménye.

A ROS-k arányának megnövekedése a GSH háromszoros csökkenését idézte elő (2. táblázat). A GSH koncentráció-függő csökkenését megfigyelték különböző máj sejtvonalakon is krónikus ZEA-kezelés hatására (Hassen és mtsai., 2007; Lee és mtsai., 2013). Miközben a peroxidokat, $O_2^{\cdot-}$ -t, $\cdot OH$ -t semlegesíti a GSH, az oxidációja során glutationil-gyökök (GS^{\cdot}) keletkeznek, amelyekből kialakul az inaktív, oxidált formája, a GSSG. A vártakkal ellentétben azonban a GSH csökkenő mennyiségével együtt a GSSG mennyisége is csökkent (3. táblázat).

A GSH és GSSG együttes csökkenése egy esetleges kölcsönhatást feltételezett a GSH és a ZEA között. Ennek felderítésére a GSH fotolumineszcens szignál-változásait vizsgáltuk különböző koncentrációjú ZEA jelenlétében. A fluoreszcens intenzitás maximuma emelkedett a toxin-koncentráció növekedésével, ami a kölcsönhatás létét igazolná (17. ábra). Ám a jelenséget intenzitás-független, fluoreszcens polarizációs méréssel vizsgálva, a GSH polarizációs foka nem változott sem a ZEA hiányában, sem jelenlétében, ami cáfolja a kölcsönhatás meglétét, mert a molekula mozgása, ezáltal fénypolarizáló hatása nem változott, tehát nem alakulhatott ki kapcsolat a két molekula között. A fotolumineszcencia-vizsgálat során tapasztalt jelenség oka a belsőszűrő hatás, amely gyakorlatilag reabszorpciót jelent, tehát a ZEA molekulák elnyelik azt a fényt, amit a GSH bocsát ki gerjesztés hatására.

Az interakció hiányában a GSH-koncentráció csökkenésének hátterében a szuperoxid és peroxidok által indukált GSH-fogyasztó folyamatok állnak. A glutation-homeosztázis fenntartásában számos antioxidáns enzim részt vesz, amelyek aktivitásváltozása toxin-specifikusnak mutatkozott (3. táblázat). A H_2O_2 -t GSH segítségével semlegesítő GPx aktivitása csökkent, ami alátámasztja, hogy ebben a folyamatban a CAT-nak van domináns szerepe. A különböző ROS-okat (pl. $\cdot OH$, HOCl, ONOO $^-$, RO $^{\cdot}$, RO $^{\cdot}_2$, NO $^{\cdot}_2$, szén-központú gyökök, 1O_2) a GSH közvetlenül is el tudja távolítani a sejtől az egy-elektron útvonalon keresztül, illetve főként a GPx által katalizált folyamatban is, a két-elektron útvonalon keresztül. A GSSG-t visszaredukáló enzim, a GR

aktivitása nőtt, feltételezhetően részben ezért csökkent a GSSG mennyisége. A GR felelős a redukált glutation-pool fenntartásáért, amihez NADPH szükséges. A NADPH előállításban, így a GSH-termelés fenntartásában fontos G6PD aktivitása csökkent, ami részben a GSH mennyiségi csökkenésének oka lehet. A GSH-t xenobiotikumokkal konjugáló, illetve a GSSG-t a sejtből az ABC-transzportereken keresztül kijuttató enzim, a GST aktivitása nőtt, magyarázva mind a GSH, mind a GSSG mennyiségének csökkenését.

Krónikus tesztekben megfigyelték a GPx aktivitásának csökkenését ZEA-val kezelt patkányokban és egerekben is (Salah-Abbés és mtsai., 2009; Stadnik és mtsai., 2010). A GST aktivitás-változását egy esetben vizsgálták akután kezelt egerekben, ahol az aktivitás csökkenését mutatták ki, amely a tesztikuláris redox-rendszer változásaira utal (Boeira és mtsai., 2012). Krónikus tesztben vizsgálták 28 napos, 40 mg/kg ZEA-kezelést követően a kísérleti Balb/c egerekben az enzimaktivitások változását, és eredményként csökkent GPx, GR, SOD, CAT és GST aktivitást figyeltek meg (Salah-Abbés és mtsai., 2010). Ebben az esetben feltételezhetően a ZEA-kezelés következtében felborult redox-egyensúly hosszú távú következményeként változnak így a különböző antioxidáns enzimaktivitások.

VII.4. A ZEA hatására bekövetkező sejtciklus-blokk és következményei

A ZEA-kezelés következtében kialakuló oxidatív stressz és a keletkező ROS-ok hatására oxidatív DNS-károsodás léphet fel, amely befolyásolhatja a sejtciklus normális lefolyását és amelyet elsőként a sejtciklus blokkján keresztül vizsgáltunk. Egy óras, 500 μ M-os ZEA-kezelést követően szignifikánsan lecsökkent a G1 fázisban lévő sejtek mennyisége, amely csökkenés a G2 fázisban kompenzálódott (18. ábra). Ez a sejtciklus blokkjára utal, amely szerint valamely külső vagy belső kedvezőtlen körülmények miatt a sejtek nem lépnek be a mitózis M fázisába. Hasonló jelenséget figyeltek meg ösztrogén receptorral szintén nem rendelkező Vero, Caco-2 és HepG2 sejt vonalakon (Abid-Essefi és mtsai., 2003; Gazzah és mtsai., 2010) illetve ösztrogén-függő emlőrák MCF-7 sejteken (Yu és mtsai., 2005) is. A blokk feltételezhető oka lehet a DNS sérülése, amelynek kijavítására leáll a sejtciklus. A DNS károsodása a *S. pombe*-ban a sejtmagok fragmentációján keresztül is vizsgálható, amelyhez a kezelt sejtek sejtmagjainak morfológiai változásait hasonlítottuk össze a kontroll sejtmagokhoz viszonyítva. Kis mértékű, koncentráció-függő emelkedést tapasztaltunk a fragmentálódott sejtmagú sejtek számában (19. ábra). A szabálytalanná váló sejtmagok a kromatinállomány sérülésére, tehát a DNS károsodására utalnak, amely magyarázza a sejtciklus blokkját.

Hímivarsejtekben is megfigyelhető volt a kromatinállomány károsodása mind 2 órás, alacsony – 5 ng ml⁻¹ (Minervini és mtsai., 2010), mind magasabb – 30-95 µM– (Tsakmakidis és mtsai., 2008) kezelési koncentráció esetén, illetve hosszabb időtartamú, 24 órás kezelés után is (Benzoni és mtsai., 2008). A kromatinállomány stabilitásának csökkenése mellett a DNS fragmentációja is kimutatható koncentráció-függő módon Vero, Caco-2 és HepG2 sejteken (Abid-Essefi és mtsai., 2003; Hassen és mtsai., 2007), amely az oxidatív károsodás következményeként alakult ki. HepG2 sejteken időfüggő DNS-károsodást is megfigyeltek, ahol az első 8 órában a fragmentáció mértéke alacsony volt, ami a 24. óra végére megduplázódott, 30 óra után pedig már igen nagy mértékű volt (Gazzah és mtsai., 2010).

A DNS-károsodások hatására a belső szabályzás leállítja a sejtciklust, hogy a különböző repair-folyamatok érvényesülhessenek, lehetőséget biztosítva a sérülések kijavítására. Ha a DNS-károsodás nagy mértékű, a hibák felhalmozódnak, a javító mechanizmusok túlterheltek lesznek és a sejt apoptózison megy keresztül. Irodalmi adatok alapján a *S. pombe*-ben a Rad3 a központi checkpoint-kináz. A DNS szerkezeti károsodása vagy a DNS-replikáció során fellépő hibák aktiválják, amely aktiváció után további kinázokat foszforilál attól függően, hogy a sejtciklus mely pontján érzékelt a hibát. A korai S fázisban a Cds1 kinázt, míg a G2 fázisban (feltételezhetően jelen esetben) a Chk1 kinázt aktiválja, amely leállítja a sejtciklust (Burhans és mtsai., 2003). Ha a DNS-repair rendszer nem tudja kijavítani a hibát, beindulnak az apoptotikus folyamatok a Wee1 és Chk1 downregulációjának következtében (Wang és mtsai., 2004).

Az oxidatív DNS-károsodás következményeként létrejövő apoptózist megfigyelték többek között HepG2 (Golli-Bennour és mtsai., 2008; Gazzah és mtsai., 2010) és Vero (Abid-Essefi és mtsai., 2003; 2012) sejtvonalakon is. A *S. pombe* esetében azonban nem figyeltünk meg apoptózist vagy nekrozist a sejt-mag-fragmentáció és a sejtciklus-blokk ellenére. Ennek oka az lehet, hogy a *S. pombe* nagyon ellenálló a mitokondriális ROS-termelés káros hatásaival szemben (mivel petite-negatív élesztő, tehát mitokondrium nélkül nem képes életben maradni). Ezt támasztja alá az is, hogy míg a *S. cerevisiae* esetében (amely egy petite-pozitív élesztő) a 3 mM-os H₂O₂ kezelés kiváltja az apoptózist (Madeo és mtsai., 1999), a *S. pombe* esetében azonban nem. Másrészt a ZEA-idukálta ROS-termelés nem feltétlenül vezet apoptózishoz a *S. pombe* esetében. Egy másik anyaggal, az adrenodoxinnal való kezelés hatására sem figyeltünk meg apoptózist. Az adrenodoxin egy mitokondriális ferredoxin, amely az emlős sejtekben található meg, és fontos szerepet játszik a szteroidogenezisben, azonban overexpressziója emelkedett ROS-termeléshez és

apoptózishoz vezet. *S. pombe*ban szintén fokozza a mitokondriális ROS-termelést, de nem észlelhetőek az apoptózis tipikus markerei. Ennek oka az, hogy a mitokondriális ROS-termelődésre egyáltalán nem alakul ki apoptotikus válasz a hasadó élesztőben (Derouet-Hümbert és mtsai., 2007).

VII.5. A szterin-összetétel változásai ZEA-kezelés hatására

Bár a ZEA nem szteroid jellegű vegyület, szerkezeti hasonlóságot mutat a β -ösztradiollal, ezért feltételeztük, hogy a szterin-bioszintézisben és a különböző komponensek összetételében is változásokat idézhet elő. Ebben az esetben hosszú távú akut kezelést végeztünk, ugyanis a sejteket korai stationer fázisig tenyésztettük 500 μ M ZEA jelenlétében. A kontroll sejtek 36, míg a kezelt sejtek 50 óra alatt érték el ezt a stationer fázist a ZEA szaporodásgátló hatása miatt.

A kontrollhoz viszonyítva szignifikáns változásokat tapasztaltunk a kezelt sejtek membránjában található ergoszterin-bioszintézis több intermediérének, illetve az ergoszterin mennyiségében is (4. táblázat). A bioszintézis köztitermékei közül a fekoszterin mennyisége megnövekedett, míg a 24-metilén-24,25-dihidrolanoszterin és a szkvalén mennyisége csökkent. Bár a szkvalén esszenciális a növekedéshez (az ergoszterin szintézis befejezése előtti hatodik intermediertől, a zimoszterintől kezdve nem esszenciálisak, mert a termelődött köztitermékek már képesek részlegesen helyettesíteni az ergoszterint) (Iwaki és mtsai., 2008), és mennyisége csökkent, a folyamat végtermékének, az ergoszterinnek a mennyisége mégis növekedett.

Az ergoszterin az élesztő membrán legfontosabb rigidizáló komponense. Fontos élettani szerepe van az optimális membrán-permeabilitás létrehozásában, kemikáliákkal szembeni rezisztencia kialakításában, a plazmamembrán fehérje-transzportjában, a membránhoz kötött enzimek megfelelő működésének kialakításában, a sporulációban, az endocitózisban (Iwaki és mtsai., 2008).

Bizonyos *Fusarium* toxinoknak – köztük a ZEA-nak – direkt, koncentráció-függő hatása van a szteroidogenezisre, amelyet sertés granulóza sejteken vizsgáltak. Alacsonyabb koncentrációban a ZEA serkentette az ösztadiol szintézist, míg magasabb koncentrációban gátolta azt (Ranziago és mtsai., 2007). Azonos sejteken végzett kutatás szerint a ZEA csökkenti a koleszterint több lépésben progeszteronra átalakító enzimek (a P450 és a 3β -hidroxiszteroid dehidrogenáz) aktivitását (Tiemann és mtsai., 2003), ami a koleszterin szintjének emelkedéséhez vezethet, ami pedig az emlős membrán legfontosabb rigidizáló eleme.

Mivel a szterinek a legfontosabb membránlipid-osztály, ezért az összetételükben bekövetkező változás megváltoztathatja a membrán funkcióit is. Változhat a membrán áteresztő-képessége a különböző ionokkal szemben (Pesti és mtsai., 1982), a belső oxidatív stresszorokkal szembeni érzékenység (Gazdag és mtsai., 2011b), a diffúziós molekulák (pl. glicerin) felvétele, és a plazmamembránhoz kötött enzimek aktivitása.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a ZEA *S. pombera* gyakorolt nem-hormonális, akut toxikus hatásai közé tartozik a GSH kiürülése a sejtől anélkül, hogy adduktokat formálna vele. A GSH-kiürülés oka a $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 , de nem a $\cdot OH$ felhalmozódott mennyisége, amely aktiválja a Pap1 transzkripció faktorát, amely olyan specifikus antioxidáns enzimek aktivációját idézi elő, mint a SOD-ok, CAT, GR, és a GSH-fogyasztó GST. A ZEA-val kezelt sejtek törekednek a felborult oxidoredukciós egyensúly helyreállítására az antioxidáns enzimszisztéma szabályozásán keresztül, de ez nem elég ahhoz, hogy a sejt kivédje a sejtciklus G2/M fázisblokkját, a sejtmagok fragmentációját és a szterin-összetétel változásait.

Tehát a ZEA megfigyelt akut toxicitását, idő-és koncentráció-függő, eltérő hatásait az alábbi, sejtszinten ható folyamataival tudjuk magyarázni: (i) a hasadó élesztő sejtfalának bioadszorpciója gyors folyamat, a toxin 20%-a diffundál a sejtbe 6 perc alatt (a disszertációban); (ii) a ZEA képes módosítani a plazmamembrán funkcióit azáltal, hogy megváltoztatja az azt felépítő szterinek összetételét (a disszertációban); (iii) csökkenti a GSH mennyiségét ROS-indukált GSH-fogyasztó folyamatok indukálásával (Hassen és mtsai., 2007; Salah-Abbès és mtsai., 2008; a disszertációban), de nem lép vele közvetlenül interakcióba, így nem alakít ki ZEA-GSH adduktokat (a disszertációban); (iv) hatására a sejtben belül felhalmozódik a $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 , míg a $\cdot OH$ nem (a disszertációban), tehát megemelkedik a sejtek össz-ROS tartalma (Bennour és mtsai., 2008; Bouaziz és mtsai., 2008; Gazzah és mtsai., 2010; Stadnik és mtsai., 2010; Abid-Essefi és mtsai., 2012); (v) aktiválja a redox-szenzitív Pap1 transzkripció faktorát (a disszertációban), amely segítségével a sejt képes adaptálódni azáltal, hogy bizonyos antioxidáns enzimek specifikusan aktiválódnak (Abid-Essefi és mtsai., 2012; Boeira és mtsai., 2012; a disszertációban); (vi) az előidézett oxidatív stressz következtében kialakulhat apoptotikus sejthalál egyes emlős sejtvonalakon (Boussema és mtsai., 2008; Banjerdpongchai és mtsai., 2010; Gazzah és mtsai., 2008) azáltal, hogy a DNS károsodik és fragmentálódik a sejtmagokban (Abid-Essefi és mtsai., 2003; a disszertációban), azonban ez a jelenség a *S.*

pombe esetében nem figyelhető meg (a disszertációban), (vii) ezért a sejtciklus leblokkol a G2/M fázis határán (Abid-Essefi és mtsai., 2004; Yu és mtsai., 2005; a disszertációban).

VII.6. A PAT citotoxikus hatása elleni védekezés a *S. pombe*ban

Az Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszéken elsőként részletes vizsgálatokra kiválasztott toxin, amely csökkentette a *S. pombe* életképességét, a PAT volt. A kutatásokba 2008-ban kapcsolódtam be. Ekkorra már az elvégzett vizsgálatok eredményeiből ismert volt, hogy a PAT minimális gátló koncentrációja a hasadó élesztővel szemben 162,2 μM , amely a sejtek 95%-ának növekedését meggálolta NCCLS 2002-es szabványú mikrodilúciós módszerrel 10^3 ml^{-1} sejten vizsgálva (Horváth és mtsai., 2010). 50 μM PAT enyhe hatással volt a sejtek növekedésére, minimális csúszást okozva a sejtek logaritmusos fázisba lépésében. 500 és 1000 μM azonban már 32% és 83%-kal csökkentette a sejtek osztódását, amelyek 10 illetve 20 órával később érték el a logaritmusos fázist (Horváth és mtsai., 2010). Hasonló jelenséget figyeltek meg a *S. cerevisiae* esetében is, ahol 500 ppm patulin gátló hatással volt a sejtek növekedésére, azonban még nem volt letális (Iwahashi és mtsai., 2006).

A kezdeti növekedésgátlás feloldása adaptációs mechanizmus létét feltételezte, amelyet Horváth és mtsai. (2010) ki is mutattak. 10, 30, 50 és 500 μM PAT 22,4%, 27,4%, 61,9% és 95,7%-os csökkenést mutatott a telepformáló sejtek számában egy óras kezelés után. A sejteket egy órán át előkezelve a szubinhibitor 10 μM -os PAT-koncentrációval, a telepképző sejtek száma 83,7%-ra, illetve 58,3%-ra emelkedett 50, illetve 500 μM -os kezelést követően, tehát a sejtekben adaptáció alakult ki a PAT-tal szemben (Horváth és mtsai., 2010). A sarjadzó élesztő génexpressziós profiljának elemzése során világossá vált, hogy a PAT-kezelés aktiválja a fehérje-degradációs folyamatokat, a kéntartalmú aminosav-metabolizmust és az oxidatív stressz elleni védekező mechanizmus enzimeit, amely magyarázhatja a megfigyelt adaptációs folyamatot (Iwahashi és mtsai., 2006).

A PAT vegetatív hasadó élesztő sejtek általi felvétele relatíve gyors folyamat, ugyanis a sejtek 20 perc alatt a toxin 14%-át képesek felvenni. Ezen bioszorpciósi folyamat hátterében az állhat, hogy a PAT kölcsönhatásba lép a sejtfa és a plazmamembrán külső felszínének szabad tiolt és kéntartalmú aminosavakat tartalmazó makromolekuláival (Fliege és Metzler, 1999). A PAT plazmamembránra gyakorolt hatásának pontosabb vizsgálatához sejtfa nélküli protoplasztokat kezeltek különböző koncentrációjú PAT-tal, majd a membránt 5-SASL-lal jelölték, és a változásokat EPR spektroszkópia segítségével vizsgálták. Ezek alapján a fázistranziós hőmérséklet koncentráció-függően csökkent,

tehát a PAT fluidizálta a hasadó élesztő sejtek membránját azáltal, hogy interakcióba lépett a membrán lipid-komponenseivel. Bár a PAT membránra gyakorolt hatásával néhány indirekt vizsgálat már foglalkozott, amelyben vese sejtvonalakon az intracelluláris fehérjék és a Ca^{2+} kiáramlását mutatták ki (Braunberg és mtsai., 1982; Riley és Showker, 1991), az EPR-es vizsgálat az első, direkt bizonyíték a membrán struktúrájának és funkciójának PAT-általi változására (Horváth és mtsai., 2010). A membránintegritás csökkenésével a sejtől olyan, a szabad intracelluláris térből származó anyagok – nukleotidok, nukleozidok, szabad bázisok – áramolhatnak ki, amelyek 260 nm-en abszorbeálják a fényt (Lee és Lewis, 1968). 50, 500 és 1000 μM PAT-kezelés hatására a *S. pombe* sejtek elvesztették ezen anyagok 25, 30,5 és 34%-át 20 percen belül, ezzel közvetlen is bizonyítva, hogy a PAT felborítja a membrán normális fiziológiáját és működését (Horváth és mtsai., 2010). LLC-PK₁ vese sejtvonalon szintén megfigyelték, hogy a sejtekből K^+ -ionok áramlanak ki, míg Na^+ -ionok áramlanak be PAT-kezelés hatására (Riley és mtsai., 1990).

A membránra gyakorolt károsító hatása miatt a PAT-tal kezelt *S. pombe* sejtek ozmoregulációja felborul, amelynek hatására változások következnek be a sejtek morfológiájában is. Alacsonyabb, 50 μM -os kezelés hatására a sejtek összezsugorodtak, amely az apoptózis egyik tipikus jele, azonban apoptotikus testek nem alakultak ki. 90 és 180 perces, 50 és 500 μM PAT-kezelést követően transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken a sejtekben extenzív vakuolarizáció figyelhető meg, valamint a festődési intenzitás csökkenése, amely az intracelluláris anyagok elvesztésére utal. Scanning elektronmikroszkópos képeken vizsgálva stacioner fázisú kontroll és 500 μM PAT-tal kezelt sejteket észrevehető, hogy míg a kontroll sejtek a 35. óra végére befejezték osztódásukat, addig a kezelt sejtek alakja megnyúlt, amely arra utal, hogy az osztódási folyamat időben elhúzódott vagy nem következett be tökéletesen. Emellett a kezelt sejtek kissé meg is duzzadtak (Horváth és mtsai., 2012a).

A PAT-kezelés hatására kialakuló sejtpusztulás hátterében az oxidatív stressz áll. Az intracelluláris $\text{O}_2^{\cdot-}$ mennyisége koncentráció-függően megemelkedett 1,23-, 1,82- és 2,44-szeresére 50, 500 illetve 1000 μM PAT-kezelést követően. A peroxidok mennyisége is emelkedést mutatott hasonló koncentrációk alkalmazása után. Itt a növekedés 1,47-, 1,56-, illetve 2,6-szeres volt. A ROS-ok emelkedő jelenlétére a sejt védekező mechanizmusai aktivizálódnak, ugyanis megnövekszik a $\text{O}_2^{\cdot-}$ -t és a peroxidokat semlegesítő enzimek, a CuZnSOD és a CAT specifikus aktivációja (Papp és mtsai., 2012).

Ahhoz, hogy meghatározhassuk, hogy mely jelátviteli útvonal(ak) mely lépése(i) felelős(ek) a külső oxidatív stresszorokra adott transzkripcionális válaszok szabályzásáért,

ezáltal az adaptáció kialakításáért, deléciós mutánsokon határoztuk meg a minimális gátló koncentrációt 0-600 μM -os koncentráció tartományban. A deléciós mutánsok közül a $\Delta pap1$ mutatkozott a legérzékenyebbnek, mert már 50 μM -os koncentráció is 95%-os gátlást okozott a szaporodásában, míg 75 μM 100%-ban gátolta azt, míg hasonló kezelési koncentrációk mellett a szülői törzs túlélése csaknem 100%-os volt (20. ábra). Így a PAT esetében is elmondhatjuk azt, amelyet a ZEA esetében szintén megfigyeltünk, miszerint az adaptációért, azon belül az oxidatív stressz elleni védekezésben részt vevő gének expressziós változásaiért elsősorban a redox-szenzitív Pap1 transzkripciós faktor a felelős, amelynek az aktivációja független a MAP kaskádtól (Vivacos és mtsai., 2006).

Azonban a $\Delta pap1$ mellett, magasabb toxin-koncentráció esetén (600 μM), a $\Delta wis1$, a $\Delta styl$ és az $\Delta atf1$ is érzékenynek bizonyult, bár a szaporodásgátlás mértéke alacsonyabb volt, miközben a szülői törzsnél csak 10%-os gátlás mutatkozott (20. ábra). Az Atf1 transzkripciós faktort foszforiláló kaskád két utolsó eleme a wis1 és a styl, így elmondható, hogy a MAPK is részt vesz a szabályzásban.

A MAPK kaskád bármely elemének mutánsai számára problematikus az adaptáció a PAT által okozott stresszel szemben, azonban vizsgálatainkból egyértelműen kiderül, hogy a legnagyobb mértékben a $\Delta pap1$ mutánsok az érintettek. A Pap1 transzkripciós faktor hiányában a *S. pombe* képtelen adaptálódni az 50-600 μM PAT által okozott oxidatív stresszel szemben.

Több más sejtvonalon is kimutatták a MAPK szabályzó szerepét a PAT-indukálta stresszel szemben. HEK293 sejtvonalon mind a p38 kináz, mind a JNK részt vesz a szignalizációban és a toxin-specifikus válaszok kiváltásában idő- és koncentráció-függő emelkedést mutatva a foszforilációban, bár meg kell jegyezni, hogy a p38 kináz szignalizációs útvonal a PAT-indukálta sejthalál kiváltásában játszik szerepet (Liu és mtsai., 2006).

A PAT-tal kezelt *S. pombe* sejtekben szignifikánsan alacsonyabb volt a GSH koncentrációja, mint a kontroll sejtekben, ennek következtében emelkedett meg a gyökök mennyisége (Papp és mtsai., 2012). Ennek oka, hogy a PAT-nak magas az elektrofil reaktivitása, képes kovalensen kötődni a fehérjék, így a GSH SH-csoportjához, és velük adduktokat képezni, amelyet SDS-PAGE gélelektroforézis segítségével ki is mutattak (Fliege és Metzler, 1999). A PAT és a BSA fehérje ciszteinjének szabad tiols csoportjaival kialakított direkt interakcióját kalorimetrikus és fotolumineszcens módszerekkel mutatták ki a termodinamikus és kinetikai tulajdonságai alapján (Horváth és mtsai., 2012b).

A fluoreszcens vizsgálatok alátámasztják az irodalomban már leírt kölcsönhatás meglétét. Növekvő toxin-koncentráció mellett a GSH fotolumineszcens szignálja is erősödött (23. *ábra*), jelezve az interakciót, amelyet az intenzitás-független polarizációs módszer is alátámasztott. A polarizációs fok értékének változása jelzi, hogy megváltozott a vizsgált molekula mérete (az addukt sokkal nagyobb, mint a GSH önmagában) és mozgása. A kölcsönhatás erősségét a számolt logK érték jelzi ($\log K = 28$), amely 1:1 sztöchiometriai arány mellett igen erős kölcsönhatást jelez. A kialakult GSH-PAT-komplexet feltételezhetően három C-H \cdots O és egy S-H \cdots O hidrogén-kötés stabilizálja. Mivel a PAT-ról ismert volt, hogy képes kötődni a GSH szulfhidril-csoportjaihoz, és az alkalmazott módszerrel ezt sikeresen bizonyítottuk, a későbbiekben ez szolgált alapul a ZEA-GSH kölcsönhatás-vizsgálatok eredményének validálásához.

A csökkenő GSH-koncentráció mellett a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb volt a GSSG koncentrációja is, amelynek oka lehet, hogy a GSH egy része a PAT-tal adduktot formál, és nem oxidálódik, valamint a GST specifikus aktivációja is emelkedett a kezelt sejtekben. A GST eltávolítja a xenobiotikumokat, így az adduktokat is a sejtől, ezzel csökkentve mind az oxidált, mind a visszaredukált glutation mennyiségét (Papp és mtsai., 2012).

A koncentráció-függő oxidatív DNS-károsodás jelei megfigyelhetők a kezelt sejtek sejtmag-morfológiai változásain keresztül (21. *ábra*). 90 perces kezelés után alacsony, 50 μ M PAT-kezelés hatására a megváltozott, fragmentálódott sejtmagú sejtek aránya 3,12-szeresére emelkedett a kontrollhoz viszonyítva. Ugyanez az arány 500 μ M-os kezelés után 4,87-szoros növekedést mutatott (21. *B és C ábra*).

Alacsony koncentrációjú kezelés után mitotikus blokkot és mikronukleuszok kialakulását figyelték meg kínai hörcsög V79 sejtvonalon (Pfeiffer és mtsai., 1998), míg HL-60 sejteken kromatin-kondenzációt és nukleáris fragmentációt idézett elő az egyszeri PAT-kezelés (Wu és mtsai., 2008). Hosszútávú (60 napos), tartós kezelés után a kezelt patkányok dendritikus sejtjeiben szintén kromatin-kondenzációt, valamint kromatin-marginációt és a sejtmagok lízisét regisztrálták (Özsoy és mtsai., 2008).

A PAT által okozott toxicitás különböző következményeiként kialakuló oxidatív stressz, DNS-károsodás, a kromoszómák rendellenességei, a mikronukleuszok képződése, a sejtmagok fragmentációja mind megfigyelhetők különböző emlős sejtvonalakon (Alves és mtsai., 2000.; Liu és mtsai., 2003), amelyek következtében – ha a sérülések olyan mértékűek, hogy a javító rendszerek túlterheltek lesznek – beindulnak az apoptotikus folyamatok.

Az apoptózis jellemző morfológiai bélyegei közé tartoznak a kikerekedett sejtek, a sejt térfogatának csökkenése, a piknózis, vagyis a kromatin kondenzációja és zsugorodása, a sejt szervecskék változásai, a sejtmagi fragmentáció, a plazmamembrán kitüremkedései és a plazmamembrán integritásának megváltozása. Ezek közül több jellemző marker is felfedezhető a *S. pombe* esetében is (Horváth és mtsai., 2012a), azonban a figyelemre méltó hasonlóságok ellenére az apoptózis-szerű sejthalál az egysejtű, rigid sejtfallal rendelkező élesztők esetében nem teljesen egyezik meg az állati sejteknél tapasztaltakkal (Low és Yang, 2008). Közös markerek azonban a kromatin-kondenzáció és a nukleáris fragmentáció, bár a DNS létrázódását nem lehet megfigyelni a *S. pombe* esetében, mert a DNS hasítása csak specifikus régiókra korlátozódik. Az élesztők apoptózisának közös jellemzője még a megnövekedett ROS-termelés (Burhans és mtsai., 2003).

Az egysejtűeknél is fontos szerepe van a programozott sejthalálnak evolúciós fitnessük szempontjából, hiszen az egysejtűek természetes populációi sem izoláltan növekednek, hanem kolóniákat, nagy hálózatokat, ún. biofilmeket hozak létre, így a rendellenes (pl. vírussal fertőzött) sejtek pusztulása a közösség túlélését segítheti (Burhans és mtsai., 2003). A *S. pombe* azonban rendkívül ellenálló az oxidatív stressz káros hatásaival szemben, emellett a megfigyelt morfológiai bélyegek sem utalnak egyértelműen apoptózisra vagy nekrozisra, ellentétben a PAT-tal kezelt HL-60 sejtvonalon (Wu és mtsai., 2008) és az egérbőrön (Saxena és mtsai., 2009) megfigyeltekkel.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a PAT *S. pombe* sejtekre gyakorolt toxikus hatásai közé tartozik a GSH sejtbeli kiürülése azáltal, hogy adduktokat formál vele, emellett a sejtben megnövekedett mennyiségben jelenlévő $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 , (de nem a $\bullet OH$) szintén hozzájárul a GSH intracelluláris koncentrációjának csökkenéséhez. Mindezen folyamatok aktiválják a Pap1 transzkripciós faktort, amely megnöveli a megfelelő antioxidáns enzimek (pl. CuZn SOD, CAT, GST) specifikus aktivitását.

A PAT legtöbb toxikus hatása magyarázható azzal, hogy sejten belüli nukleofil vegyületekkel adduktokat alakít ki (Fliege és Metzler, 1999), ezáltal (i) feltételezhetően inaktiválja a sejtfalhoz kötött enzimeket (nincs elérhető adat); (ii) csökkenti a plazmamembrán fázistranzíciós hőmérsékletét, így a sejt esszenciális összetevőket veszít (Horváth és mtsai., 2010); (iii) a GSH mennyiségének csökkenését idézi elő (Barhoumi és Burghardt, 1996; Papp és mtsai., 2012) aminek következtében megnő a $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 , (de nem a $\bullet OH$) mennyisége (Papp és mtsai., 2012); (iv) aktiválja a pap1 transzkripciós faktort mind a hasadó élesztőben (a disszertációban), mind az egérben (Saxena és mtsai., 2011),

amely adaptációt idéz elő a toxinnal szemben (Horváth és mtsai., 2010) azáltal, hogy szelektíven aktivál bizonyos antioxidáns enzimeket, amelyek hozzájárulnak a sejt túléléséhez (Papp és mtsai., 2012); (v) kölcsönhatásba lép a citoszkeleton fehérjével, befolyásolva ezzel a sejtmagok osztódását és a javító folyamatokat, amelyek következtében kialakul az élesztőnél az ún. cdc fenotípus és a kromatin szerkezetében is változások következnek be (Saxena és mtsai., 2009; Horváth és mtsai., 2012a; a disszertációban); (vi) oxidatív stresszt indukál, amely az állati sejtek esetében apoptózishoz vezet (Wang és mtsai., 2007). A PAT okozta ROS-felhalmozódás fontos szerepet játszik az adaptációs folyamatok kialakulásában, így a PAT károsító hatásai főként a fehérjék és enzimek károsításán keresztül fejtik ki hatásukat.

VIII. Összefoglalás

Kísérleteink során az ösztrogén-receptorral vagy azzal analóg fehérjével nem rendelkező *S. pombe* hasadó élesztő sejteken akut tesztekben vizsgáltuk a ZEA nem ösztrogén-specifikus, citotoxikus hatásait, a toxin által előidézett oxidatív stressz-folyamatokat és azok szabályzását, valamint kerestük a toxin eddig ismeretlen, lehetséges támadáspontját, támadáspontjait.

1.1. Kimutattuk, hogy a ZEA koncentráció-függő sejtpusztulást idéz elő, a MIC_{50} értéke $500 \mu M$, és szaporodásgátló, a generációs időt befolyásoló hatása is függ az alkalmazott koncentrációtól. Elsőként vizsgáltuk a ZEA felvétel-kinetikáját. A sejtek rövid idő alatt (25 perc) felveszik a toxin kb. 40%-át, amelyből 20% a sejtfalon megkötődik, mert annak bioadszorpciós kapacitása van, míg a fennmaradó mennyiség a sejtekbe diffundál.

1.2. Legjobb tudomásunk szerint először bizonyítottuk, hogy szubinhibitor koncentrációval előkezelve a sejteket, azoknak megnő a túlélése magasabb kezelési koncentráció mellett, tehát a sejtek képesek adaptálódni a ZEA-val szemben.

Bizonyítottuk, hogy az adaptációs mechanizmus hátterében elsősorban a redox-szenzitív transzkripciós faktor, a Pap1 áll, amelynek hiányában a deléciós mutáns törzs túlélése már alacsony kezelési koncentrációknál is igen alacsony volt a kontrollhoz viszonyítva. Kisebb mértékben ugyan, de a MAPK kaszkád transzkripciós faktora, az Atf1 is érintett a specifikus szabályzásban.

1.3. Új eredményünk, hogy a ZEA-kezelés hatására már korábban kimutatott megemelkedett ROS-mennyiség hátterében a peroxidok és a $O_2^{\cdot-}$ állnak. $500 \mu M$ ZEA hatására a sejtekben a peroxidok mennyisége 1,8-szeresére, míg a $O_2^{\cdot-}$ mennyisége kétszeresére növekedett, azonban a $\cdot OH$ mennyiségében, valamint a sejtek Cr(VI) redukciós kapacitásában nem figyeltünk meg szignifikáns változást.

1.4. Megállapítottuk, hogy a sejt reagál az emelkedett ROS-mennyiségre, és a már fentebb ismertetett jelátviteli útvonalakon keresztül toxin-specifikusan szabályozza az antioxidáns enzimek aktivitását. A legfontosabb nem enzimatis antioxidáns molekula, a GSH koncentrációja szignifikánsan lecsökkent, ahogy oxidált formájának mennyisége is.

1.5. A GSH és a ZEA között nem mutattunk ki direkt kölcsönhatást, továbbá a szakirodalomban nem említik a ZEA GSH-szintézist befolyásoló hatását, ezért ezek hiányában feltételezhető, hogy a GSH mennyiségi csökkenését a GSH-fogyasztó redox folyamatok idézik elő.

1.6. A ZEA által előidézett oxidatív stressz hatására bekövetkezik a DNS károsodása, amelyet a sejtmagok fragmentációján keresztül ki is mutattunk. Ezeket a károsodásokat a sejt igyekszik kijavítani, amelyet a G2/M fázis határán bekövetkező sejtciklus-blokk jelez. Mindezek ellenére azonban apoptotikus sejthalált nem tudunk kimutatni.

1.7. Kimutattuk a membrán szterin-összetételének mennyiségi változásait, amelyek a membránfunkciók esetleges változásait idézhetik elő.

Új eredményeink alapján elmondható, hogy a ZEA nem ösztrogén-specifikus, oxidatív stressz-indukáló hatása, amelyet olyan modellszervezeten vizsgáltunk, amely bizonyítottan nem tartalmaz ösztrogén receptort, vagy hasonló funkciójú más fehérjét, legalább olyan fontos, mint hormonhatásával összefüggő, egészségkárosító hatásai.

Tanszékünkön már korábban folytak vizsgálatok a PAT oxidatív stressz-indukáló valamint membrán-fluidizáló hatásával, és annak következményeivel kapcsolatban. Ezen kutatások során vált ismertté, hogy *S. pombe* modellszervezeten a PAT hatására megemelkedik a $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 intracelluláris mennyisége, amire válaszolva a sejt szabályozza a különböző antioxidáns enzimeinek specifikus aktivitását.

2.1. A kutatási programba bekapcsolódva kimutattuk, hogy elsődlegesen a Pap1 transzkripciós faktor aktivációjára indukálódnak az oxidatív védekezésben részt vevő gének, és, ugyan kisebb mértékben, de a MAPK-kaszád több eleme is érintett, tehát a szabályzásban feltételezhetően a kaszád-rendszer és az általuk aktivált Atf1 transzkripciós faktor is szerepet játszik.

2.2. A PAT által indukált oxidatív stressz érinti a DNS-t is, mert a sejtmagok rendellenességeit, fragmentációját mutattuk ki koncentrációfüggő mértékben.

2.3. Irodalmi adatokból már ismert volt, hogy a PAT képes keresztkötéseket kialakítani a fehérjék SH-csoportjaival, valamint a PAT-tal kezelt sejtekben jelentősen lecsökkent a GSH és GSSG mennyisége. Az általunk végzett fotolumineszcens és intenzitásfüggetlen polarizációs módszerek segítségével sikerült kimutatni ezt a kölcsönhatást, így a módszert a későbbiekben validáltan alkalmazhattuk más toxinok GSH-val való interakciójának kimutatására.

IX. Summary

In all of our experiments the fission yeast *S. pombe* was used as a model organism, because it does not have estrogen receptors or analogous proteins. It is therefore suitable for investigations of non-estrogen-specific, cytotoxic, oxidative stress-generating effects, the unknown target molecules of ZEA and the intracellular regulation mechanisms of the cells.

1.1. ZEA induced concentration-dependent cell damage. The MIC₅₀ was 500 μM, and its growth-inhibitory effect depended on the concentration applied. The cells took up approximately 40% of the toxin within 20 min. The cell wall had a bioadsorbing capacity because it bound 20% of the toxin, the remaining amount entering the cell via diffusion.

1.2. As far as we are aware, this is the first description of the adaptation phenomenon against ZEA. Cells pretreated with a subinhibitory concentration of ZEA showed an increased survival rate after ZEA treatment with a higher dosage.

The adaptation process is regulated primarily by the redox-sensitive transcription factor Pap1. In the absence of this transcription factor, the survival rate of the deletion mutant strain was much lower than that of the parental strain after treatment with a lower concentration of ZEA. The transcription factor Atf1 of the MAPK cascade was also partially affected in the regulation process.

1.3. 500 μM ZEA induced 1.8-fold and 2-fold increases in the intracellular amounts of H₂O₂ and O₂^{-•}, respectively, but the concentration of •OH and the Cr(VI) reduction capacity of the cells did not change significantly.

1.4. The cells regulated the activity of the antioxidant enzymes specifically via the known signalling pathways as a consequence of the increased ROS concentrations.

The concentration of the most important non-enzymatic antioxidant molecule GSH decreased significantly and the quantity of GSSG also decreased.

1.5. The reason for the depletion of GSH in the absence of a direct GSH-ZEA interaction is related to the ROS-induced GSH-consuming processes.

1.6. ZEA induced oxidative DNA damage, which was demonstrated by the occurrence of fragmented nuclei. When the cells repair the damage, the cell cycle is arrested in the G2/M phase. However, apoptotic cell death was not detected.

1.7. In our only chronic test quantitative changes in the sterol composition of the treated cells were observed; these may result in changes in the membrane functions.

Our novel results indicate that the non-estrogen-specific, oxidative stress-inducing ability of ZEA is at least as important as the estrogen-specific harmful effects.

The oxidative stress-generating and plasma membrane-fluidizing effects of PAT and the consequences of these effects were investigated earlier by our research group. These experiments demonstrated the ROS-generating effect of PAT and the regulation of the specific activity of the antioxidant enzymes.

2.1. Investigations of the signalling pathways of the regulation revealed that the primary regulatory element of the antioxidant defence mechanisms was the transcription factor Pap1. However, the MAPK cascade and its transcription factor Atf1 also played important roles in the regulation.

2.2. The oxidative stress generated by PAT affected the DNA of the cells, inducing aberration and fragmentation of the nuclei in a concentration-dependent manner.

2.3. It is known from the literature that PAT is capable of forming cross-links with the SH groups of the proteins, and the concentrations of GSH and GSSG decrease significantly after PAT treatment. The interaction between PAT and GSH was demonstrated through photoluminescence and intensity-independent polarization measurements. We can therefore use these validated methods in our later experiments with other toxin-GSH interactions.

X. Irodalomjegyzék

Abid-Essefi, S., Baudrimont, I., Hassen, W., Ouanes, Z., Mobio, T.A., Anane, R., Creppy, E.E., Bacha, H. 2003. DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by vitamin E. *Toxicology*, **192**, 237-248.

Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E., Bacha, H. 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol. in Vitro* **18**, 467-474.

Abid-Essefi, S., Bouaziz, C., El Golli-Bennour, E., Ouanes, Z., Bacha, H. 2009. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites α -zearalenol and β -zearalenol on cultured human Caco-2 cells. *J. Biochem. Mol. Toxic.* **23**, 233-243.

Abid-Essefi, S., Zaied, C., Bouaziz, C., Salem, I.B., Kaderi, R., Bacha, H. 2012. Protective effect of aqueous extract of *Allium sativum* against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress. *Exp. Toxicol. Pathol.* **64**, 689-695.

Alves, I., Oliveira, N.G., Laires, A., Rodrigues, A.S., Rueff, J. 2000. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis* **15**, 229-234.

Anderson, M. 1995. Determination of glutathione and glutathione disulphide in biological samples. *Meth. Enzymol.* **113**, 548-555.

Arai, N., Ström, A., Rafter, J.J., Gustaffson, J-Å. 2000. Estrogen receptor β mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **270**, 425-431.

Ayed-Boussema, I., Bouaziz, C., Rjiba, K., Valenti, K., Laporte, F., Bacha, H., Hassen, W. 2008. The mycotoxin zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicol. in Vitro* **22**, 1671-1780.

Banjerdpogchai, R., Kongtawelert, P., Khanamat, O., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, F., Subhasitanont, P., Svati, J. 2010. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells. *J. Hematol. Onco.* **3**, 50. doi:10.1186/1756-8722-3-50

Barhoumi, R., Burghardt, R.C. 1996. Kinetic analysis of the chronology of patulin- and gossypol-induced cytotoxicity *in vitro*. *Fundam. Appl. Toxicol.* **30**, 290-297.

Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 497-516.

Bennour, E.G., Bouaziz, C., Ladjimi, M., Renaud, F., Bacha, H. 2008. Comparative mechanisms of zearalenone and ochratoxin A toxicities on cultured HepG2 cells: oxidative stress a common process? *Environ. Toxicol.* **24**, 538-548.

Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D., Visconti, A. 2008. Influence of *in vitro* exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reprod. Toxicol.* **25**, 461-467.

Birkinshaw, J.H., Michael, S.E., Bracken, A., Raistrick, H. 1943. Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. *Lancet* **245**, 625.

- Boeira, L.S., Bryce, J.H., Stewart, G.G., Flannigan, B. 1999. Inhibitory effect of *Fusarium* mycotoxins on growth of brewing yeasts. 1 Zearalenone and fumonisin B₁. *J. I. Brewing* **105**, 366-374.
- Boeira, S.P., Filho, C.B., Del'Fabbro, L., Royes, L.F.F., Jessé, C.R., Oliveira, M.S., Furian, A.F. 2012. Possible role for glutathione S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice. *Toxicol* **60**, 358-366.
- Bouaziz, C., Sharif el dein, O., El Golli, E., Abid-Essefi, S., Brenner, C., Lemaire, C., Bacha, H. 2008. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology* **254**, 19-28.
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S., Bachhawat, A.K. 2000. Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 13259-13265.
- Boussema, A.I., Bouaziz, C., Rjiba, K., Valenti, K., Laporte, F., Bacha, H., Hassen, W. 2008. The mycotoxin zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicol. in Vitro* **22**, 1671-1780.
- Braunberg, R.C., Gantt, O.O., Friedman, I. 1982. Toxicological evaluation of compounds found in food using rat renal explants. *Food Chem. Toxicol.* **20**, 541-546.
- Burhans, W.C., Weinberger, M., Marchetti, M.A., Ramaschandran, L., D'Urso, G., Huberman, J.A. 2003. Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mut. Res.* **532**, 227-243.
- Carter, W.O., Narayanan, P.K., Robinson, J.P. 1994. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 253-258.
- CAST, 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Council of Agricultural Science and Technology. Task Force Rep. No. 139. CAST, Ames, IA.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., Bäler, J. 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cel.* **14**, 214-229.
- Chiu, D.T., Stults, F.H., Tappel A.L. 1976. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* **445**, 558-566.
- Cho, Y.W., Park, E.H., Lim, C.J. 2000. Catalase, glutathione S-transferase and thioltransferase respond differently to oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 344-348.
- Cho, Y.W., Park, E.H., Fuchs, J.A., Lim, C.J. 2002. A second stress-inducible glutathione S-transferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1574**, 399-402.
- Derouet-Hümbert, E., Dragan, C.A., Hakki, T., Bureik, M. 2007. ROS production by adrenodoxin does not cause apoptosis in fission yeast. *Apoptosis* **12**, 2135-2142.
- 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.

- Drusch, S., Kopka, S., Kaeding, J. 2007. Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food Chem.* **100**, 192-197.
- 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.
- Etienne, M., Dourmad, J.Y. 1994. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review. *Livest. Prod. Sci.* **40**, 99-113.
- Ferrer, E., Juan-García, A., Ruiz, M.J. 2009. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol. in Vitro* **23**, 1504-1509.
- Fink-Gremmels, J., Malenkinejad, H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim. Feed Sci. Tech.* **137**, 326-341.
- Fliege, R., Metzler, M. 1999. The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks *in vitro* involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and alphaamino groups. *Chem. Biol. Interact.* **123**, 85-103.
- Gazdag, Z., Fujs, S., Kőszegi, B., Kálmán, N., Papp, G., Emri, T., Belágyi, J., Pócsi, I., Raspor, P., Pesti, M. 2011a. The *abc1/coq8* respiratory deficient mutant of *Schizosaccharomyces pombe* suffers from glutathione underproduction and hyperaccumulates Cd²⁺. *Folia Microbiol.* **56**, 353-359.
- Gazdag, Z., Kőszegi, B., Certik, M., Máté, G., Thürmer, K., Belágyi, J., Pesti, M. 2011b. Examination of oxidative stress sensitivity and oxido-reduction state of *Saccharomyces cerevisiae* Δ erg5 ergosterol mutant. The Czechslovak Society for Microbiology. 39th Annual Conference on Yeasts. Smolenice, Slovakia, May 3-6, p. 73.
- Gazzah, A.C., Golli Bennour, E., Bouaziz, C., Abid, S., Ladjimi, M., Bacha, H. 2010. Sequential events of apoptosis induced by zearalenone in cultured hepatocarcinoma cells. *Mycotox. Res.* **26**, 187-197.
- Giga-Hama, Y., Kumagai, H. 1997. Foreign gene expression in fission yeast: *Schizosaccharomyces pombe*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gershman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O. 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science* **119**, 623-629.
- Gille, G., Sigler, K. 1995. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol.* **40**, 131-152.
- Golli-Bennour, E., Bouaziz, C., Ladjimi, M., Renaud, F., Bacha, H. 2008. Comparative mechanisms of zearalenone and ochratoxin A toxicities on cultured HepG2 cells: Is oxidative stress a common process? *Environ. Toxicol.* **24**, 538-548.
- Golli-Bennour, E., Bacha, H. 2011. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology* **287**, 1-7.
- Gutz, H. 1974. Handbook of Genetics, Vol. 1, Plenum Press, New York, London.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York.
- Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Oscoz, A.A., Lopez, A.D.C., Bacha, H. 2007. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in HepG2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology* **232**, 294-302.
- Heneweer, M., Houtman, R., Poortman, J., Groot, M., Maliepaard, C., Peijnenburg, A. 2007. Estrogenic effects in the immature rat uterus dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology approach. *Toxicol. Sci.* **99**, 303-314.
- Heussner, A.H., Dietrich, D.R., O'Brien, E. 2006. *In vitro* investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicol. in Vitro* **20**, 332-341.
- 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.* **49**, 1898-1904.
- Horváth, E., Nagy, G., Turani, M., Balogh E., Papp, G., Pollák, E., Pócsi, I., Pesti, M., Bánfalvi, G. 2012a. Effect of the fungal mycotoxin patulin on the chromatin structure of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Basic Microb.* **52**, 1-11.
- Horváth, E., Kálmán, N., Pesti, M., Iwata, K., Kunsági-Máté, S. 2012b. Thermodynamic and kinetic processes during the folding of BSA in the presence of the mycotoxin patulin. *Acta Biol. Hung.* **63**, 389-398.
- IARC 1986. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation, Vol. 40, Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC, Lyon, pp. 67-82.
- Ikeda, K., Morigasaki, S., Tatebe, H., Tamanoi, F., Shiozaki, K. 2008. Fission yeast TOR2 complex activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell Cycle* **7**, 1-7.
- Ikner, A., Shiozaki, K. 2005. Yeast signalling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.* **569**, 13-27.
- Iwahashi, Y., Hosoda, H., Park, J.H., Lee, J.H., Suzuki, Y., Kitagawa, E., Murata, S.M., Jwa, N.S., Gu, M.B., Iwahashi, H. 2006. Mechanism of patulin toxicity under condition that inhibit yeast growth. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1936-1942.
- Iwaki, T., Iefuji, H., Hiraga, Y., Hosomi, A., Morita, T., Giga-Hama, Y., Takegawa, K. 2008. Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* **154**, 830-841.
- Jeong, J.H., Kwon, E.S., Roe, J.H. 2001. Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **283**, 908-914.

- Jiang, C., Sarrel, P.M., Lindsay, D.C., Poole-Wilson, P.A., Collins, P. 1991. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -oestradiol *in vitro*. *Brit. J. Pharmacol.* **104**, 1033-1037.
- Kálmán, N., Gazdag Z., Certik, 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 Microb.* **54**, 215-225.
- Kim, S.J., Park, E.H., Lim, C.J. 2004a. Stress-dependent regulation of the gene encoding γ -glutamylcysteine synthetase from the fission yeast. *Mol. Biol. Rep.* **31**, 23-30.
- Kim, S.J., Kim, H.G., Kim, B.C., Park, E.H., Lim, C.J. 2004b. Transcriptional regulation of glutathione synthetase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cells* **18**, 242-248.
- Kim, D.U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H.O., Won, M. et al. 2010. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* **28**, 617-623.
- Kouadio, J.H., Mobio, T.A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S.D., Creppy, E.E. 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* **213**, 56-65.
- Kovács, F., Ványi, A., Domány, S. 1995. Penészgombák – mikotoxinok – népegészségügy. *Magyar Tudomány* **40**, 1293-1305.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H. 1987. Risk assesment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharm.* **7**, 253-306.
- Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T. (eds). 2011. *The yeasts: a taxonomic study*. Access Online via Elsevier.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Fröhlich, K.U., Breitenbach, M. 2001. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microb.* **39**, 1166-1173.
- Lee, T.C., Lewis, M.J. 1968. Mechanism of release of nucleotidic material by fermentin brewer's yeast. *J. Food Sci.* **33**, 124-128.
- Lee, K.S., Röschenhaler., R.J. 1986. DNA-damaging activity of patulin in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1046-1054.
- Lee, J., Dawes, I.W., Roe, J.H. 1995. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiology* **141**, 3127-3132.
- Lee, J., Dawes, I.W., Roe, J.H. 1997. Isolation, expression and regulation of the *pgr1+* gene encoding glutathione reductase absolutely required for the growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **272**, 23042-23049.
- Lee, S., Lee, J., Roe, J.H. 2000. Subcellular localization of catalase encoded by the *ctl1+* gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Microbiol.* **38**, 156-159.

- 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. Commun.* **297**, 854-862.
- Lee, S.Y., Song, J.Y., Kwon, E.S., Roe, J.H. 2008. Gpx1 is a stationary phase-specific thioredoxin peroxidase in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 67-71.
- Lee, H., Kang, C., Yoo, Y.S., Hah, D.Y., Kim, C.H., Kim, E., Kim, J.S. 2013. Cytotoxicity and the induction of the stress protein Hsp 70 in Chang liver cells in response to zearalenone-induced oxidative stress. *Environ. Toxicol. Pharm.* **36**, 732-740.
- Liu, B.H., Yu, F.Y., Yu, T.S., Lee, S.Y., Su, M.C., Wang, M.C., Shih, S.M. 2003. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **191**, 255-63.
- Liu, B.H., Wu, T.S., Yu, F.Y., Wang, C.H. 2006. Mycotoxin patulin activates the p38 kinase and JNK signaling pathways in human embryonic kidney cells. *Toxicol. Sci.* **89**, 423-430.
- Liu, B.H., Wu, T.S., Yu, F.Y., Su, C.C. 2007. Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicol. Sci.* **95**, 340-347.
- Low, C.P., Yang, H. 2008. Programmed cell death in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1335-1349.
- Madani, N.D., Malloy, P.J., Rodriguez-Pomo, P., Krishnan, A.V., Feldman, D. 1994. *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that inhibited by estradiol. *Microbiology*, **91**, 922-926.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., Fröhlich, K.U. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **145**, 757-767.
- Martin-Kuan, M., Ehrlich, V., Delatour, T., Cavin, C., Schilter, B. 2011. Evidence for a role of oxidative stress in the carcinogenicity of ochratoxin A. *J. Toxicol.* doi:10.1155/2011/645361.
- McNutt, S.H., Purwin, P., Murray, C. 1928. Vulvovaginitis in swine. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **73**, 484-492.
- Metzler, M., Pfeiffer, E., Hildebrand, A.A. 2010. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotox. J.* **3**, 385-401.
- Minervini, F., Lacalandra, G.M., Filannino, A., Nicassio, M., Visconti, A., Dell'Aquila, M.E. 2010. Effects of *in vitro* exposure to natural levels of zearalenone and its derivatives on chromatin structure stability in equine spermatozoa. *Theriogenology*, **73**, 392-403.
- Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W. 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **1**, 8-21.
- Mosser, B.A., Russel, P. 2000. Cell cycle regulation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 631-636.

- Mutoh, N., Nakagawa, C.W., Yamada, K. 2002. Characterization of Cu,Zn-superoxide dismutase-deficient mutant of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **41**, 82-88.
- Nakagawa, C.W., Yamada, K., Mutoh, N. 1999. Identification of the catalase gene promoter region involved in superinduction in *Schizosaccharomyces pombe* caused by cycloheximine 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.
- Oberley, L., Spitz, D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth. Enzymol.* **105**, 457-464.
- Omar, H.E-D.M. 2013. Mycotoxins-induced oxidative stress and disease In: (ed.) Makun, H. A., Mycotoxin and food safety in developing countries. InTech, Rijeka.
- Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., Anane, R., Mobio, T., Creppy, E.E., Bacha, H. 2003. Induction of micronuclei by zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of vitamin E. *Mutat. Res.* **538**, 63-70.
- Özsoy, N., Selmanoglu, G., Kockaya, E.A., Gül, N., Cebesoy, S. 2008. Effect of patulin on the interdigitating dendritic cells (IDCs) of ret thymus. *Cell. Biochem. Funct.* **26**, 192-196.
- 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.
- Penninckx, M.J. 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* **2**, 295-305.
- Pesti, M., Paku, S., Novák, E.K. 1982. Some characteristics of nystatin-resistant sterol mutants of *Candida albicans*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **29**, 55-56.
- Peterson, G. 1983. Determination of total protein. *Meth. 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., Mata, A., López-Barea, J. 1984. Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 1-12.
- Pócsi, I., Prade, R.A., Penninckx, M.J. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **49**, 1-76.
- Pohland, A.E., Schuller, P.L., Steyn, P.S. 1982. Physicochemical data for some selected mycotoxins. *Pure Appl. Chem.* **54**, 2219-2284.
- Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* **2**, 613-631.

- Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* **2**, 219-236.
- Ranziego, G., Caloni, F., Cremonesi, F., Aad, P.Y., Spicer, L.J. 2007. Effects of *Fusarium* mycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. *Anim. Reprod. Sci.* **107**, 115-130.
- Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A.A., Fanelli, C. 2010. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 899-911.
- Riley, R.T., Hinton, D.M., Showker, J.L., Rigsby, W., Norred, W.P. 1990. Chronology of patulin-induced alterations in membrane function of cultured renal cells, LLC.PK₁. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **102**, 128-141.
- Riley, R.T., Showker, J.L. 1991. The mechanism of patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **109**, 108-126.
- 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. *Mycopathologia* **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.
- Sabatinos, S.A., Forsburg, S.L., 2010. Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Method. Enzymol.* **470**, 759-795.
- Salah-Abbès, J.B., Abbès, S., Houas, Z., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R. 2008. Zearalenone induces immunotoxicity in mice: possible protective effects of radish extract (*Raphanus sativus*). *J. Pharm. Pharmacol.* **60**, 761-770.
- Salah-Abbès, J.B., Abbès, S., Abdel-Wahhab, M.A., Oueaslati, R. 2009. *Raphanus sativus* extract protects against Zearalenone induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice. *Toxicol.* **53**, 525-533.
- Salah-Abbès, J.B., Abbès, S., Haous, Z., Oueslati, R. 2010. *Raphanus sativus* extract prevents and ameliorates zearalenone-induced peroxidative hepatic damage in Balb/c mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 1545-1554.
- Sant'Ana, A.S., Rosenthal, A., Massaguer, P.R. 2008. The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Res. Int.* **41**, 441-453.
- Saxena, N., Ansari, K.M., Kumar, R., Dhawan, A., Dwivedi, P.D., Das, M. 2009. Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p53 and p21/WAF1 proteins in skin of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **234**, 192-201.
- Saxena, N., Ansari, K.M., Kumar, R., Chaudhari, B.P., Dwivedi, P.D., Das, M. 2011. Role of mitogen activated protein kinases in skin tumorigenicity of patulin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **257**, 264-271.

- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 995-1014.
- Schumacher, D.M., Metzler, M., Lehmann, L. 2005. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Arch. Toxicol.* **79**, 110-21.
- Schumacher, D., Müller, C., Metzler, M., Lehmann, L. 2006. DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. *Toxicol. Lett.* **166**, 268-275.
- 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.
- Shi, X., Kachirskaia, I., Walter, K.L., Kuo, J.H., Lake, A., Davrazou, F., Chan, S.M., Martin, D.G.E., Fingerman, I.M., Briggs, S.D., Howe, L., Utz, P.J., Kutateladze, T.G., Lugovskoy, A.A., Bedford, M.T., Gozani, O. 2007. Proteome-wide analysis of *Saccharomyces cerevisiae* identifies several PHD fingers as novel direct and selective binding modules of histone H3 methylated at either lysine 4 or lysine 36. *J. Biol. Chem.* **282**, 2450-2455.
- Siam, R., Dolan, W.P., Forsburg, S.L. 2004. Choosing and using *Schizosaccharomyces pombe* plasmids. *Methods* **33**, 189-198.
- Sipiczki, M. 1989. Taxonomy and Phylogenesis. In: (eds) Nasim, A., Young, P., Johnson, B.F. *Molecular biology of the fission yeast*. Academic Press, San Diego.
- Song, J.Y., Cha, J., Lee, J., Roe, J.H. 2006. Glutathione reductase and a mitochondria thioredoxin play overlapping roles in maintaining iron-sulfur enzymes in fission yeast. *Eukariot. Cell* **5**, 1857-1865.
- Stadnik, A., Wójtowitz-Chomicz, K., Borzecki, A. 2010. Influence of zearalenone on free radical reactions in rat liver cells. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **54**, 611-615.
- Sunnerhagen, P. 2002. Prospects for functional genomics in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **42**, 73-84.
- Surai, P.F., Mezes, M., Melnichuk, S.D., Fotina, T.I. 2008. Mycotoxins and animal health: from oxidative stress to gene expression. *Krmiva* **50**, 35-43.
- Tiemann, U., Tomek, W., Schneider, F., Vanselow, J. 2003. Effects of the mycotoxins α - and β -zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. *Reprod. Toxicol.* **17**, 673-681.
- Toone, W.M., Jones, N. 1998. Stress-activated signaling pathways in yeast. *Genes Cells* **3**, 485-498.
- Tsakmakidis, I.A., Lymberopoulos, A.G., Khalifa, T.A.A., Boscós, C.M., Saratsi, A., Alexopoulos, C. 2008. Evaluation of zearalenone and α -zearalenol toxicity on boar sperm DNA integrity. *J. Appl. Toxicol.* **28**, 681-688.
- Varga, J., Téren, J., Tóth, B., Kocsubé, S., Rigó, K. 2009. *Gombák másodlagos anyagcseretermékei: mikotoxinok, gombamérgek*. JATEPress, Szeged.

- Vivacos, 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, X., Wang, Y., Kim, H.P., Nakahira, K., Ryter, S.W., Choi, A.M.K. 2007. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *J. Biol. Chem.* **282**, 1718-1726.
- Wang, Y., Decker, S.J., Sebolt-Leopold, J. 2004. Knockdown of Chk1, Wee1 and Myt1 by RNA interference abrogates G2 checkpoint and induces apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 305-313.
- Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C., Mannervik, B. 1985. Glutathione transferases from human liver. *Meth. Enzymol.* **113**, 499-504.
- Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W.M., Shieh, J.C., Toda, T., Miller, J.B.A., Jones, N. 1996. The Atf1 transcription factor is a target for Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* **10**, 2289-2301.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **415**, 871-880.
- Wu, P.Y.J., Winston, F. 2002. Analysis of Stp7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5367-5379.
- Wu, T.S., Liao, Y.C., Yu, F.Y., Chang, C.H., Liu, B.H. 2008. Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Toxicol. Lett.* **183**, 105-111.
- Würgler, F.E., Friedrich, U., Schlatter, J. 1991. Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* **261**, 209-216.
- Yamada, K., Nakagawa, C.W., Mutoh, N. 1999. *Schizosaccharomyces pombe* homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stresses and works as an antioxidant. *Yeast*, **15**, 1125-1132.
- Yazar, S., Omurtag, G.Z. 2008. Fumonisin, trichotecenes and zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 2062-2090.
- Yiannokouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C-G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany, J-P. 2004. Alkali extraction of β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3666-3673.
- Yu, Z., Zang, L., Wu, D., Liu, F. 2005. Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **62**, 441-446.
- Yu, J.Y., Zheng, Z.H., Son, Y.O., Shi, X., Jang, Y.O., Lee, J.C. 2011. Mycotoxin zearalenone induces AIF- and ROS-mediated cell death through p53- and MAPK-dependent signaling pathways in RAW264.7 macrophages. *Toxicol. In Vitro* **25**, 1654-1663.
- Zain, M.E. 2010. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chemic. Soc.* **15**, 129-144.

Zhou, S., Jiang, L., Geng, C., Zhong, L. 2010. Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicon*, **55**, 390-395.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Manes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1-18.

Zomborszky, K.M. 2004. A penészgombák toxinjainak állategészségügyi vonatkozásai. *MezőHír Mezőgazdasági szaklap* **8**, 100-101.

Weblapok

1. webhely: Pombe net - Forsburg Lab, University of Southern California: <http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/main2.html> (elérhető: 2014. január 20.)

2. webhely: PomBase – The scientific resource for fission yeast, Wellcome Trust, University of Cambridge, European Bioinformatics Institute, University College London: <http://genomebrowser.pombase.org/Multi/blastview> (elérhető: 2014. január 24.)

3. webhely: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Rockville Pike, Bethesda MD, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2100> (elérhető: 2014. június 23.)

4. webhely: <http://www.biotwiki.org/foswiki/bin/view/Pombe/NurseLabManual> (elérhető 2014. május 29.)

5. webhely: NextProt beta: http://www.nextprot.org/db/entry/NX_Q92830 (elérhető: 2014. június 23.)

6. webhely: PomBase – The scientific resource for fission yeast, Wellcome Trust, University of Cambridge, European Bioinformatics Institute, University College London: <http://www.pombase.org/spombe/result/SPCC613.08> (elérhető: 2014. június 23.)

7. webhely: GeneCards – The Human Gene Compendium, Weizmann Institute of Science: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCCIP> (elérhető: 2014. június 23.)

8. webhely: Wikipedia – The free encyclopedia, Wikimedia Foundation, Inc: <http://en.wikipedia.org/wiki/PHF1>(elérhető: 2014. június 23.)

XI. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Pesti Miklós egyetemi tanár úrnak a téma kijelöléséért, az iránymutatásért és a munkám feltételeinek biztosításáért. Szakmai szemlélete sokáig irányadó lesz további munkám során.

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Gazdag Zoltán témavezetőmnek elméleti és gyakorlati tanácsaiért, emberségéért és szakmaszeretetéért, amellyel engem is lelkesített.

Szeretném megköszönni Dr. Papp Gábornak, hogy a kezdetektől diplomadolgozatom egyik témavezetőjeként, majd kollégaként segítette munkámat. Köszönöm az inspiráló szakmai beszélgetéseket és a barátságát.

Köszönöm Prof. Kunsági-Máté Sándor tanár úrnak és Dr. Czibulya Zsuzsannának, hogy lehetővé tették és segítették az Általános és Fizikai Kémia Tanszéken a fluoreszcens kölcsönhatás-vizsgálatok elvégzését és az eredmények értékelésénél nyújtott segítségüket.

Köszönöm Prof. Milan Čertiknek, a Slovak University of Technology tanszékvezető tanárának, hogy segítségével lehetőségem volt a szterin-tartalom gázkromatográfiás vizsgálatára.

Köszönöm PhD hallgató társamnak, Máté Gábornak a kísérletek kivitelezése során nyújtott gyakorlati és elméleti segítségét és őszinteségét, amely mindig előre vitt.

Köszönöm az Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék valamennyi közreműködő munkatársának a segítségét és támogatását.

Köszönöm a szüleimnek minden segítségüket, támogatásukat, szeretetüket és hitüket, amely nélkül mindez nem sikerült volna. Köszönöm páromnak, Henn Tamásnak, hogy együtt örült velem a sikereknek és rendületlenül bíztatott a nehézségek idején.

XII. Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló, nemzetközi folyóiratban megjelent tudományos közlemények:

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 and Chemical Toxicology, 50, 3792-3798. **IF: 2,999**

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. **IF: 2,924**

Az értekezésben nem szereplő nemzetközi folyóiratban megjelent ill. közlésre elküldött tudományos közlemények:

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 and Chemical Toxicology, 59, 636-642. **IF: 3,010**

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* (submitted)

Papp G., Máté G., **Mike N.**, Gazdag Z., Pesti M. (2014) 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:

Papp G., Horváth E., **Mike N.**, Gazdag Z., Belágyi J., Pollák E., Gyöngyi Z., Bánfalvi G., Pesti M. Examination of the mode of action of patulin on fission yeast. 5th Hungarian Mycological Conference, Budapest, Hungary, 2012.

Mike N., Papp G., Gazdag Z., Máté G., Czibulya Zs., Kunsági-Máté S., Milan Č., Pesti M. Non-estrogenic, oxidative stress inducing effects of the mycotoxin zearalenone in the fission yeast. II. Interdisciplinary Doctoral Conference 2013, Pécs, Hungary, 2013.

Mike N., Papp G., Gazdag Z., Máté G., Czibulya Zs., Kunsági-Máté S., Certik 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, Hungary, 2013.

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek:

Papp G., Horváth E., Gazdag Z., **Mike N.**, Sipos G., Vágvölgyi Cs., Pesti M.: Zearalenone caused cytotoxic effect and adaptation in *Schizosaccharomyces pombe*. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése, Keszthely, Hungary, 2010.

Horváth E., Papp G., Gazdag Z., Belágyi J., **Mike N.**, Hornok L., Vágvölgyi Cs., Pesti M.: Regulation of patulin-induced oxidative stress processes in *Schizosaccharomyces Pombe*. 39th Annual Conference on Yeasts, Smolenice, Slovak Republic, 2011.

Horváth E., Nagy G., Turáni M., Balogh E., Papp G., **Mike N.**, Pollák E., Gyöngyi Z., Pesti M., Bánfalvi G.: Patulin-induced cytological alterations and chromatin changes in fission yeast. 39th Annual Conference on Yeasts, Smolenice, Slovak Republic, 2011.

Mike N., Papp G., Gazdag Z., Echevarria E., Virág E., Türmer K., Vágvölgyi Cs., Pesti M.: Regulation of zearalenone-induced oxidative stress processes in fission yeast. 5th Hungarian Mycological Conference, Budapest, Hungary, 2012.

Czibulya Zs., **Mike N.**, Pesti M., Kunsági-Máté S.: Interaction between zearalenone and glutathione. Symposium on Weak Molecular Interactions. Pécs, Hungary, 2013.

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

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