

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

PÉCS, 2014

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. Ezek gazdasági és élelmezés-egészségügyi szempontból fontos vegyületek, az élelmiszerekben, takarmányokban maximálisan megengedett koncentrációjukat 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 terápiák kifejlesztése és hatékonyságának növelése, esetleges rezisztens haszonnövények nemesítése megvalósítható.

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 stressz hatás 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 gyulladós bélbetegségek, kardiovaszkuláris megbetegedések, arteriosclerosis) egyaránt erre a folyamatra vezethető vissza.

A hasadó élesztő sejtjei is a megfelelő receptorok segítségével érzékelik a megváltozott körülményeket, különböző jelátviteli útvonalakat aktiválnak, amelyek úgy változtatják a sejtek génexpressziós profilját, hogy a védekezésben résztvevő antioxidánsok (pl. peptidok, vitaminok, flavonoidok és karotinoidok: glutation (GSH), aszkorbinsav, tokoferol, β -karotin, stb.), és antioxidáns enzimek (pl. kataláz (CAT), szuperoxid-dizmutáz (SOD), glutation-peroxidáz (GPx), glutation-reduktáz (GR), glutation S-transzferáz (GST),

stb.) aktiválása segítse a túlélést és a megváltozott körülményekhez történő adaptációt. A stresszre adott válaszok közt megkülönböztetünk általános környezeti stressz választ és specifikus környezeti stressz választ. A központi válasz megegyezik a legtöbb stressz esetében, tehát különböző stressz hatások ugyanazt a védekező mechanizmust aktiválhatják azáltal, hogy azonos jelet generálnak, amely azonos transzkripciós faktorokat fog aktiválni, így kialakítva egy általános stressz választ. Ebben az esetben olyan gének expressziója indukálódik, amelyek a szénhidrát-metabolizmusban, a reaktív oxigén-származékok semlegesítésében, a megfelelő fehérjeszerkezet felvételében, 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.

A mikotoxinok hatásmechanizmusának vizsgálatához éppen ezért választottuk modellorganizmusnak a *S. pombe*-t, hiszen komplex vizsgálati módszerekkel rendelkezünk az oxidatív stressz folyamatainak és szabályzásuknak a vizsgálatát illetően. A *S. pombe* sok szempontból 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. Az általunk vizsgált két toxin hatásairól már rendelkezünk információkkal, de a kísérleteket nagyon különböző sejt- és szövettípusokon, élőlényeken végezték, így egy toxin hatásairól kapott információk igen eltérőek lehetnek. Egy jól definiált modellen vizsgálva őket azonban az általunk kapott eredmények összehasonlíthatóak.

Célkitűzések

A PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékének egyik kutatási területe a különböző mikotoxinok hatásmechanizmusának, elsősorban az általuk indukált oxidatív stressznek a vizsgálatával foglalkozik *S. pombe* hasadó élesztő sejteken.

Ennek keretében 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 stressz folyamatokat 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 reaktív oxigén gyökök (ROS-ok) – $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ – 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 ergoszterinrel, 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 szabályozódnak a sejtben belül?
- 2.2. Bekövetkezik-e a DNS-t érintő oxidatív károsodás? Ha igen, akkor akkor mértékű-e, hogy apoptózist váltson ki, amelynek a sejt morfológiai jelei érzékelhetőek?
- 2.3. Az általunk használt fotolumineszcens és polarizációs módszerek segítségével kimutatható-e a közvetlen kölcsönhatás az ismert SH-csoportokkal keresztköti patulin és a GSH között?

Alkalmazott módszerek

A vizsgálatainkhoz az *S. pombe* ura4⁻D18 h⁻, uracil auxotróf, heterotallikus törzset használtuk. A jelátviteli útvonal (MAPK) vizsgálatához egy szülői törzset (leu 1-32 ura4-D18 his 7-366 ade6-M210, h⁺), valamint annak deléciós mutánsait: $\Delta wis1$ (*wis1::ura4 leu 1-32 ura4-D18, h⁻*), $\Delta sty1$ (*sty1::ura4 leu 1-32 ura4-D18 ade6-704, h⁺*), $\Delta atf1$ (*atf1::ura4 leu 1-32 ura4-D18, h⁺*) és $\Delta pap1$ (*pap1::ura4 leu 1-32 ura 4-D18, h⁺*) alkalmaztuk.

Kísérleteinkhez mindig középlogaritmikus fázisú tenyészeteket használtunk, hogy a sejtek azonos fiziológiai állapotban legyenek. A sejtek gyűjtése, mosása minden esetben centrifugálással történt, 1017 g-n (3000 fordulat perc^{-1}), 5 percig. A kísérletekhez 405,5 mM koncentrációjú PAT törzsoldatot, valamint 300 mM koncentrációjú ZEA törzsoldatot használtunk acetonitrilben, illetve etanolban oldva. A kísérletek során az oldószer végkoncentrációját minden esetben 0,8%-ra állítottuk be.

A minimális gátló koncentráció (MIC), szaporodásgátlás, pusztítás és adaptáció meghatározása, felvétel-kinetika

A ZEA *S. pombe* gyakorolt szaporodásgátló hatását 0, 100, 500 és 1000 μM koncentráció mellett vizsgáltuk 10^6 sejt ml^{-1} induló sejtszámmal. A sejtosztódás mértékét az optikai denzitás meghatározásán keresztül végeztük spektrofotométerrel 595 nm-en. A ZEA-val és a PAT-tal szembeni MIC meghatározása standard mikrodilúciós módszer segítségével történt (NCCLS M27-A) a *S. pombe* és a MAPK mutáns törzsek esetében is. A ZEA által előidézett sejtpusztulást, valamint a vele szemben kialakuló adaptációt szélesztésekkel határoztuk meg.

10^7 db ml^{-1} sejtfalas sejtet és protoplasztot 0,6 M-os KCl-ben 500 μM ZEA-val kezeltünk, és különböző időpontokban (0, 5, 10, 20, 30, 60 perc) mintát vettünk. A sejteket lecentrifugáltuk, a felülúszót 269 nm-en fotometráltuk és a kalibrációs görbe alapján meghatároztuk a sejtek által felvett ZEA koncentrációját.

ROS mérések

Az intracelluláris peroxid gyök méréséhez a sejteket dihidrorodamin 123 (DHR 123), míg a szuperoxid gyök méréséhez dihidroetidium festékekkel jelöltük. A méréshez BD FACSCalibur áramlási citométert használtunk. 15 perces, 500 μM -os ZEA kezelés után 15, 30, 45, és 60 perccel mértük a mintákban a ROS koncentráció változását. A mérés során 10000 sejtet vizsgáltunk. A gerjesztési hullámhossz mindkét festék esetében 488 nm volt, az emissziós hullámhossz a DHR 123 esetében 530 nm, míg a dihidroetidium esetében 585 nm volt.

A hidroxilgyök intracelluláris koncentrációját és a Cr(VI) redukáló képességen keresztül a sejt oxidoredukciós egyensúlyát EPR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk.

Az antioxidáns enzimek specifikus aktivitásának és a glutation koncentrációjának a meghatározása

A GR, GST, GPx, G6PD, CAT, CuZn-SOD és Mn-SOD valamint az oxidált és redukált glutation intracelluláris aktivitásának méréséhez, valamint a fehérjetartalom meghatározásához kolorimetriás vizsgálatokat alkalmaztunk.

Mikotoxin-GSH interakció

Mind a ZEA, mind a PAT esetében a toxin törzsoldatából hígításokat készítettünk, megfelelő arányban küvetában összemértük, és a GSH fluoreszcens szignálját detektáltuk 315 nm-es excitációs hullámhosszon, miközben a koncentrációját végig állandó értéken

tartottuk. Fluorolog $\tau 3$ spectrofluorométer (Jobin- Yvon/SPEX, Longjumeau, France) segítségével vettük fel a fotolumineszcens spektrumokat.

A kapott eredmények validálására intenzitás-független fluoreszcens polarizációs vizsgálatot végeztünk. Ehhez a GSH polarizációs fokváltozásait detektáltuk 315 nm excitációs és 420 nm emissziós hullámhosszon ZEA illetve PAT jelenlétében és hiányában.

Áramlási citometriás sejtciklus analízis, sejtmag-morfológiai vizsgálatok, apoptózis és nekrosis kimutatása

A sejtciklus blokk vizsgálatához 10^7 sejt ml^{-1} szuszpenziót kezeltünk 500 μM ZEA-val 60 percig, majd a sejtek előkészítését a megadott protokoll (ForsburgLab Protocols) szerint végeztük. A különböző fázisú sejtek vizsgálatához Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométert használtunk.

A sejtmag-morfológiai vizsgálatokhoz 10^8 sejt ml^{-1} szuszpenziót kezeltünk 500 és 1000 μM ZEA-val illetve 50 és 500 μM PAT-tal. 4-5 μl sejtsuszpenziót szétoszlattunk tárgylemezen, majd beszáradás után 3 μl DAPI festékkel ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) jelöltük, és fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse 80i, UV szűrővel) vizsgáltuk a sejteket, majd fotókat készítettünk, átlagosan 500 sejtmagot vizsgáltunk mintánként.

Az apoptotikus és nekrotikus sejtek kimutatásához protoplasztokat kezeltünk 500 és 1000 μM ZEA-val, majd a sejteket Annexin V és propidium-jodid festékkel jelöltük, és áramlási citométerrel detektáltuk.

Össz-szterin-tartalom meghatározás

500 μM ZEA-val kezelt, korai stacioner fázisú sejtekből a megfelelő protokoll alapján a teljes szterin-tartalmat kiextraháltuk, majd gázkromatográfiával elemeztük, és a kapott csúcsokat GC-MS analízissel meghatároztuk.

Eredmények és értékelésük

A. S. pombe törzs általános jellemzése

Standard mikrodilúciós módszer segítségével, az NCCLS 2002-es szabvány szerint meghatároztuk a ZEA minimális gátló koncentrációját az általunk vizsgált *S. pombe* törzsszel szemben. Teljes gátlást nem tapasztaltunk, azonban a MIC_{50} érték 500 μM volt, amely koncentrációt a további vizsgálatainkhoz alkalmaztunk.

A szakirodalomban legtöbbször a ZEA ösztrogén-specifikus hatásaival foglalkoznak, azonban kevés adat áll rendelkezésre bizonyítottan ösztrogén-analógiájától független károsító hatásiról. Ezért a munkánk során a *S. pombe*-t olyan modellszervezetként alkalmaztuk, amely bizonyítottan nem tartalmaz a β -ösztrogén receptorral analóg szekvenciát, vagy a *Candida albicans* ösztrogén-kötő fehérjééhez hasonló szekvenciát. A β -ösztradiol minimális gátló koncentráció vizsgálatának eredménye szintén alátámasztja a receptor hiányát, hiszen semmilyen növekedést befolyásoló hatást nem gyakorolt a *S. pombe* sejtekre.

A ZEA citotoxikus hatása az *S. pombera*

A felvétel-kinetika során kimutattuk, hogy a sejtfalnak igen magas bioadszorpciós kapacitása van. A sejtfal nélküli protoplasztok a toxin 20%-át vették fel, míg a sejtfalú sejtek a 40%-át. A protoplasztok felvétel-kinetikája azt sugallja, hogy bioakkumuláció helyett (pl. aktív transzport) diffúzió történik, amely párhuzamos a bioadszorpcióval. Mindkét görbe telítődést mutat, amely arra utal, hogy nincs a felvétel sebességével összemérhető sebességű metabolizmus a sejten belül.

ZEA kezelés hatására koncentrációfüggő szaporodásgátlást tapasztaltunk, az 500 és 1000 μM -os kezelés hatására a sejtek növekedése 83 %-ban gátlódott, amely hatás mértéke 36 óra elteltével 38 %-ra csökkent.

A mérséklődő szaporodásgátló hatás alapján feltételeztünk egy esetleges adaptációs folyamatot a toxinnal szemben. Koncentrációfüggő sejtpusztulást tapasztaltunk, mert 250, 500 és 1000 μM ZEA hatására a telepképző sejtek száma 20, 85 illetve 100 %-kal csökkent. A sejteket egy órán át előkezelve az ún. szubinhibitor koncentrációval (250 μM), jelentősen megemelkedett a telepképző sejtek száma (50%-ra és 22%-ra) 500 és 1000 μM kezelést követően, amely emelkedés bizonyítja a ZEA-val szemben kialakult adaptációt.

A ZEA oxidatív stressz indukáló hatásának vizsgálata

Vizsgálataink során a deléciós mutánsok közül a $\Delta pap1$ bizonyult a legérzékenyebbnek ZEA kezelés hatására, így elmondhatjuk, hogy a védekezésben szükséges gének expressziós változásaiért és az adaptáció kialakításáért elsősorban a Pap1 transzkripciós faktor a felelős. Azonban, bár kisebb mértékben, de ZEA-érzékenynek mutatkozott egy másik transzkripciós faktor, a MAPK útvonal által aktivált Atf1 is.

Akut, 60 perces ZEA kezelés hatására a sejtekben 1,8-szeresére növekedett a peroxidok, és kétszeresére a $\text{O}_2^{\cdot-}$ mennyisége a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Nem változott azonban szignifikánsan a $\cdot\text{OH}$ mennyisége és a sejtek Cr(VI) redukciós kapacitása *in vitro*.

Az emelkedett H_2O_2 és $\text{O}_2^{\cdot-}$ koncentrációra válaszol a sejt, mert megnövekszik az ezeket semlegesítő enzimek, a CAT és SOD specifikus aktivitása. A ROS-k arányának megnövekedése a legjelentősebb nem enzimatis antioxidáns molekula, a GSH koncentrációjának harmadára történő csökkenését idézte elő.

A GSH és GSSG együttes csökkenése egy esetleges kölcsönhatást feltételezett a GSH és a ZEA között. Ennek felderítésére a GSH fotolumineszcens szignálváltozásait vizsgáltuk különböző koncentrációjú ZEA jelenlétében. A fluoreszcens intenzitás maximuma emelkedett a toxin koncentráció növekedésével, ami a kölcsönhatás létét igazolná. 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.

Az interakció hiányában a GSH koncentráció csökkenésének hátterében a $\text{O}_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 által indukált GSH fogyasztó folyamatok állnak. A glutation homeosztázis

fenntartásában számos antioxidáns enzim vesz részt, amelyek aktivitásváltozása toxin-specifikusnak mutatkozott. A H₂O₂-t GSH segítségével semlegesítő GPx aktivitása csökkent, a GSSG-t visszareduláló enzim, a GR aktivitása nőtt, feltételezhetően részben ezért csökkent a GSSG mennyisége. 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 sejtől kijuttató enzim, a GST aktivitása nőtt, magyarázva mind a GSH, mind a GSSG mennyiségének csökkenését.

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, melyet a sejtciklus blokkján keresztül vizsgáltunk. Egy órás, 500 µM-os ZEA kezelést követően szignifikánsan lecsökkent a G1 fázisban lévő sejtek mennyisége, amely csökkenés a G2 fázisban kompenzálódott.

A blokk feltételezhető oka lehet a DNS sérülése, amelynek kijavítására leáll a sejtciklus. A DNS károsodása a *S. pombe*-ben a sejtmagok fragmentációján keresztül is vizsgálható, amelyhez a kezelt sejtek sejtmagjainak morfológiai változásait hasonlítottuk össze a kontrolléval. Kismértékű, koncentrációfüggő emelkedést tapasztaltunk a fragmentálódott sejtmagú sejtek számában. A szabálytalanná váló sejtmagok a kromatinállomány sérülésére, tehát a DNS károsodására utalnak, amely magyarázza a sejtciklus blokkját. Az oxidatív DNS károsodás következményeként létrejövő apoptózist megfigyelték számos sejtvonalon, a *S. pombe* esetében azonban nem figyeltünk meg apoptózist vagy nekrozist a sejtmag-fragmentáció és a sejtciklus blokk ellenére sem.

A szterin összetétel változásai ZEA kezelés hatására

Bár a ZEA nem szteroid jellegű vegyület, szerkezeti hasonlóságot mutat a β-ösztadiollal, ezért feltételeztük, hogy a szterin bioszintézisben és a különböző komponensek összetételének arányában is változásokat idézhet elő. A kontrollhoz viszonyítva szignifikáns változott a kezelt, korai stacioner fázisú sejtek membránjában található több intermedier aránya, illetve az ergoszterinnek a mennyisége is. Mivel a szterinek a legfontosabb membránlipid osztály, ezért az összetételükben bekövetkező változás megváltoztathatja a membrán funkcióit is.

A PAT citotoxikus hatása elleni védekezés a *S. pombe*-ben

A PAT oxidatív stressz generáló hatása, valamint az arra adott kompenzáló válasz a specifikus antioxidáns enzimek aktivitásának és a GSH mennyiségének a szabályzásán keresztül már korábbi tanszéki kutatásokból ismert volt.

A külső oxidatív stresszorokra adott transzkripcionális válaszok szabályzásában a MAPK-nak van szerepe a *S. pombe* esetében. A deléciós mutánsok közül a $\Delta pap1$ mutatkozott a legérzékenyebbnek, mert már 50 µM-os koncentráció is 95%-os gátlást okozott a szaporodásában és 75 µM 100%-ban gátolta azt, míg hasonló kezelési koncentrációk mellett a szülői törzs túlélése csaknem 100%-os volt. Azonban a $\Delta pap1$ mellett, magasabb toxinkoncentráció esetén (600 µM), a $\Delta wis1$, a $\Delta sty1$ és az $\Delta atf1$ is érzékenynek bizonyult,

bár a szaporodásgátlás mértéke alacsonyabb volt (98%, 95%, illetve 65%), miközben a szülői törzsnél csak 10%-os gátlás mutatkozott.

A MAPK kaszkád bármely elemének mutánsai számára problematikus az adaptáció a PAT által okozott stresszel szemben, azonban a legnagyobb mértékben a $\Delta pap1$ mutánsok érintettek. A Pap1 transzkripciós faktor hiányában a *S. pombe* képtelen adaptálódni a PAT által okozott oxidatív stresszel szemben.

A fluoreszcens vizsgálataink alátámasztják az irodalomban már leírt kölcsönhatás meglétét a PAT és a GSH között. Növekvő toxinkoncentráció mellett a GSH fotolumineszcens szignálja is erősödött, jelezve az interakciót, amelyet az intenzitás független polarizációs módszer is alátámasztott, ugyanis a GSH kezdeti ($3 \pm 3\%$) polarizációs foka a PAT jelenlétében jelentősen megemelkedett ($17 \pm 3\%$). A polarizációs fok értékének változása jelzi, hogy megváltozott a vizsgált molekula mérete és mozgása.

A koncentrációfüggő oxidatív DNS károsodás jelei megfigyelhetők a kezelt sejtek sejtmag-morfológiai változásain keresztül. 90 perces kezelés után 50 μM PAT hatására a megváltozott, fragmentálódott sejtmagú sejtek aránya 3,12-szeresére emelkedett a kontrollhoz viszonyítva. Ugyanez az arány 500 μM -os kezelés után 4,87-szoros növekedést mutatott.

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 μM , 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 koncentrációnál is igen alacsony volt a kontrollhoz viszonyítva. Kisebb mértékben ugyan, de a MAPK kaszkád transzkripciós faktora, az Atf1 is érintett a specifikus szabályzásában.

1.3. Új eredményünk, hogy a ZEA-kezelés hatására már korábban kimutatott megemelkedett ROS-mennyiség hátterében a peroxidok és a $\text{O}_2^{\cdot-}$ állnak. 500 μM ZEA hatására a sejtekben a peroxidok mennyisége 1,8-szeresére, míg a $\text{O}_2^{\cdot-}$ mennyisége

kétszeresére növekedett, azonban a •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 enzimatisz 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 tudtunk 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 transzkripció 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 transzkripció 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 keresztköteket 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.

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:

Á. Blaskó, **N. Mike**, P. Gróf, Z. Gazdag, Zs. Czibulya, L. Nagy, S. Kunsági-Máté, M. Pesti. (2013) Citrinin-induced fluidization of the plasma membrane of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Food and Chemical Toxicology, 59, 636-642. **IF: 3,010**

G. Máté, Z. Gazdag, **N. Mike**, G. Papp, I. Pócsi, M. Pesti. (2014) Cytotoxic processes in citrinin-treated fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Toxicon, 90, 155-166. **IF 2,924**

G. Papp, G. Máté, Z. Gazdag, **N. Mike**, M. Pesti. (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., Čertik, M., Pesti, M. The oxidative stress inducing ability of zearalenone – a non-estrogen specific effect in the fission yeast. 4TH Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 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.

A megjelent cikkek összesített impakt faktora: 11,857