

Cianobakteriális toxinok és cianobaktérium kivonatok citotoxicitásának összehasonlító vizsgálata CHO-K1 sejteken

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szerző neve: Gácsi Mariann Témavezető neve: Dr. Bánfalvi Gáspár

DEBRECENI EGYETEM Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Biológia Doktori Program Debrecen, 2009 Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Biologia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2009. október 25.

Tanúsítom, hogy Gácsi Mariann doktorjelölt 2003- 2009 között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom. Debrecen, 2009. október 25.

Dr. Bánfalvi Gáspár

Cianobakteriális toxinok és cianobaktérium kivonatok citotoxicitásának összehasonlító vizsgálata CHO-K1 sejteken

Értekezést a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a BIOLÓGIA tudományágban

Írta: Gácsi Mariann okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája (Bioreguláció Molekuláris és Fiziológiai szerveződése és Biotechnológiai vonatkozásai programja) keretében

Témavezető: Dr. Bánfalvi Gáspár

A doktori szigorlati bi	zottság:	
elnök:	Dr	
tagok:	Dr	
C	Dr	
A doktori szigorlat idő	őpontja: 200	
e	1 5	
Az értekezés bírálói:		
	Dr	
	Dr.	
	Dr	
	D1.	•••••
A bírálóbizottság:		
elnök:	Dr	
tagok:	Dr	
ç	Dr	
	Dr	
	Dr	
		•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••

Az értekezés védésének időpontja: 20....

TARTALOMJEGYZÉK

A dolgozatban alkalmazott rövidítések jegyzéke	
1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A cianobaktériumok általános jellemzése	5
2.2. A Balaton cianobaktérium világa	6
2.3. A cianotoxinokról	9
2.3.1. Hepatotoxikus ciklikus peptid típusú	
toxinok: mikrocisztinek és nodularinok	11
2.3.2. Citotoxikus alkaloidok: cilindrospermopszin	14
2.4. Az eukarióta sejtciklus és szabályozása	16
2.5. A kromatinállomány szerveződési fázisai	21
2.5.1. Az interfázisban lévő sejt kromatin-	
állományának struktúrája	21
2.5.2. A metafázisos kromoszóma szerkezete	24
2.6. A sejtek citoszkeletális komponensei	24
2.6.1. A mikrofilamentumok	25
2.6.2. A mikrotubulusok	27
2.7. Az tejsav dehidrogenáz alkalmazása	
citotoxicitási vizsgálatokban	27
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	30
3.1. Anyagok	30
3.2. A CHO-K1 sejtvonal jellemzése,	
a sejtkultúra fenntartása	30
3.3. Cianobaktérium kivonatok készítése	31
3.4. A cianotoxinokkal és cianobaktérium	
kivonatokkal történő kezelések	32
3.5. Szinkronizált sejtek előállítása és ellenőrzése	33
3.6. A sejtmag preparátumok izolálása és a kromatin	
állomány fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata	35
3.7. A sejtvázszerkezetben bekövetkezett változások	
detektálása immuncitokémiai módszerrel	35
3.8. LDH enzimaktivitás vizsgálatok	37
3.9. Statisztika	40
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	41
4.1. A CHO-K1 sejtek kromatin állományának	
szerkezetbeli változásai	41

JEGYZÉKE	113
9. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGÉNEK	
8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNITÁS	112
7. IRODALOMJEGYZÉK	
6. SUMMARY	91
5. ÖSSZEFOGLALÓ	82
és EC ₅₀ értékük	78
a CHO-K1 sejtek LDH enzim aktivitására	
4.4.2. A cianobaktérium kivonatok hatása	
sejtek LDH enzimaktivitására és EC ₅₀ értékük	74
4.4.1. A tisztított cianotoxinok hatása a	
(LDH) enzim aktivitásának változásai	74
4.4. A CHO-K1 sejtek tejsav-dehidrogenáz	
sejtek mikrotubulin szerveződésére	70
kivonatainak hatása a CHO-K1	
4.3.2. A Cylindrospermopsis raciborskii törzsek	
sejtek mikrotubulus szerveződésére	68
4.3.1. A tisztított cianotoxinok hatása a CHO-K1	
rendszerének változásai	68
4.3. A CHO-K1 sejtek mikrotubuláris	
aktin szerkezetére	63
kivonatainak hatása a CHO-K1 sejtek	
4.2.2.A Cylindrospermopsis raciborskii törzsek	
CHO-K1 sejtek aktin szerkezetére	59
4.2.1. A tisztított cianotoxinok hatása a	20
rendszerének változásai	58
4.2. A CHO-K1 seitek mikrofilamentáris	00
kondenzálás folyamatára	53
törzsek kivonatainak hatása a kromatin	
414 A Cylindrospermonsis raciborskii	77
kondenzálódására	$\overline{47}$
a CHO-K1 seitek kromatin állományának	
113 A tisztított cianotoxinok hatása	
kromatinállományának morfológiai változásai	11
A 1 2 A frakcionált seitek	41
áramlási citometriás jellemzáse	/1
A 1 1 Δ szinkronizált CHO-K1 seitek	

Rövidítések jegyzéke

ACT 9502	balatoni Cylindrospermopsis raciborskii törzs
ACT9503	balatoni Cylindrospermopsis raciborskii törzs
ACT 9504	balatoni Cylindrospermopsis raciborskii törzs
ACT 9506	balatoni Cylindrospermopsis raciborskii törzs
AQS	Ausztrál CYN-t termelő Cylindrospermopsis
	raciborskii izolátum
ANTX	anatoxin-a, 2-acetil-9-azabiciklo[4.2.1.]non2-én
APC	anaphase promoting complex, anafázist elősegítő
	komplex
ATP	adenozin trifoszfát
cdk	ciklin dependens kináz
CdkI	ciklin dependes kináz gátló
CHO-K1	Chines hamster ovary cell, kinai hörcsög
	petefészek seitvonal
CYN	cilindrospermopszin
DABCO	1.4- diazobiciklo-2.2.2-oktán
DAPI	4'.6' diamidino-2-phenylindol
DMSO	dimetil-szulfoxid
EC ₅₀	Median Effects Concentration, az a toxikus
50	mennyiség, melynél a kezelt alanyok 50%-a
	elpusztul
FBS	foetalis boriúszérum
FITC	floureszcein-izotiocianát
HANTX	homoanatoxin-a. 2-(propán-1-oxo-1-il)-9-
	azobiciklo[4,2,1]non-2én
LDH	laktát dehidrogenáz, tejsav dehidrogenáz
LPS	lipopoliszacharid
MAP	mikrotubulus asszociált protein
MAPK	mitogén aktivátor protein kináz
MC-LR	mikrocisztin-LR
MPF	mitózis promoting faktor
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
PBS	NaCl tartalmú foszfát puffer
PFA	paraformaldehid
PI	propidium-iodid
РКА	ciklikus AMP-dependens kináz
РКС	protein kináz C
PP1	protein foszfatáz 1
PP2A	protein foszfatáz 2A
PP2C	protein foszfatáz 2C
PSL PSII	egyes és kettes fotokémiai rendszer

PSP	paralitikus shelfish poisoning, paralitikus kagylo	
	mérgezés	
TrX-100	TritonX-100	

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Napjainkban egyre gyakoribb probléma a Föld felszíni vizeinek szennyeződése és ennek káros következményei. Az eutrofizáció jelenségét az '50-es években kezdték el felismerni, mely azóta is jelentős károkat okoz a vízfelhasználás legkülönbözőbb területein (turizmus, ivóviz kinyerés, mezőgazdaság, halászat). Az algásodás okozta vízminőség romlás felismerése és a védekezés módjának meghatározása megköveteli a fitoplankton mennyiségi és minőségi viszonyainak pontos megismerését és szabatos leírását.

Annak felmérésére, hogy egy-egy vízvirágzás tartalmaz-e toxint termelő cianobaktériumokat, valamint hogy ezen fajok metabolitjai milyen mértékben toxikusak, ökotoxikológiai teszteket alkalmaznak. Újabb kutatási eredmények azt bizonyítják, hogy a cianotoxinok hatással lehetnek nemcsak a fito- és zooplankton képviselőire, hanem a magasabb rendű növényekre is (Máthé és mtsai., 2009; Beyer és mtsai., 2009). A cianotoxinok az elpusztuló sejtekből a vízbe kerülve a vizet fogyasztó vadés haszonállatokra, de az ivóvíz hálózatba kerülve az emberre is potenciális (Chorus és Bartam, 1999). Mindez veszélyt jelenthetnek a cianobaktériumok toxicitásának átfogó kutatását tette indokoltá.

A Balaton vonatkozásában már 1934-ben történtek közlések az első cianobakteriális tömegprodukcióval kapcsolatban (Sebestyén, 1934). Az első fokozott mértékű *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs tömegprodukciót 1966 szeptemberében észlelték a Keszthelyi-öbölben (Hortobágyi és Kárpáti, 1967). A hetvenes évek közepétől a fonalas N₂-kötő cianobaktériumok (*Aphanizomenon* és *Anabaena* fajok) okozta nyári vízvirágzások, vízszíneződések rendszeressé váltak a tó nyugati, évekkel

később a keleti felében is (Vörös és mtsai, 1983; Gorzó és Kiss, 1985; Padisák és mtsai, 1984). Ezt a folyamatot tetézte az 1979-ben megjelent *Cylindrospermopsis raciborskii* cianobaktérium (Oláh és mtsai., 1981), amelynek inváziója során 1994 nyarán a tó vize szinte ennek a fajnak a tiszta tenyészetévé változott (Présing és mtsai., 1996).

Az esetek mind gyakoribb előfordulása, indokolttá tette tehát a Balaton esetében is a tömegprodukciót okozó cianobaktérium fajok toxicitásának vizsgálatát (Hiripi és mtsai., 1998; Kiss és mtsai., 2002).

A cianotoxinok támadáspontjuk szerint alapvetően májkárosító hepatotoxinok (cilindrospermopszin, mikrocisztin), idegrendszeri szabályozó funkciókat befolyásoló anyagok (anatoxinok és szaxitoxinok), illetve bőr irritációt kiváltó vegyületek lehetnek.

A toxintermelő törzsek azonosítását és hatásfelmérését megnehezíti, hogy ugyanazon algatörzs többféle toxint, hepatotoxin és neurotoxin jellegű vegyületeket is termelhet (Hawkins és mtsai., 1985; Pomati és mtsai., 2004). Számos fajban a termelődő toxinhatású vegyület kémiai összetétele és hatásmechanizmusa viszont nem ismert, és ugyancsak nem tisztázottak azon körülmények, melyek egy a potenciálisan toxintermelő algafaj toxintermelését indukálják. Legyen szó akár *in vivo* vagy *in vitro* kísérletekről, a toxikológiai vizsgálatok jelentősége napjainkban egyre nő.

Hiripi és munkatársai (1998) halfajokon és vándorsáskán (*Locusta migratoria migratorioides* R.F.) mutatták ki a Balatonban, ill. elsősorban a Kis-Balaton tározóiban esetenként tömegesen elszaporodó *Aphanizomenon flos-aquae, Anabaena aphanizomenoides, Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska), valamint *Microcystis aeruginosa* fajok tömegtenyészetéből készített kivonatok toxicitását. Az egyes algatörzsek által termelt toxikus hatóanyagok pontos kémiai azonosítása ugyanakkor mind a mai napig nem

történt meg. A nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* izolált központi idegrendszerén végzett elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei alapján felvetődött (Kiss és mts., 2002), hogy a Cylindrospermopsis raciborskii tenyészetéből készített, különbözőképpen tisztított algakivonat- frakciók hatásmechanizmusuk szerint eltérő komponenseket tartalmazhatnak. Ezek némelyike neurotoxikus hatású, membránmechanizmusa szerint az anatoxin-a –val mutat rokonságot (Swanson és mtsai., 1986).

Munkánk célja az volt, hogy egy toxicitási felmérést készítsünk különböző cianotoxinok (cilindrospermopszin (CYN) és mikrocisztin-LR és (MC-LR)cianobakteriális kivonatok (a bizonyítottan cilindrospermopszint termelő C. raciborskii törzsből készült kivonat (AQS) és balatoni C. raciborskii izolátumokból (ACT 9502, ACT 9503, ACT 9504, ACT 9505 készült kivonatok) CHO-K1 sejtkultúrára gyakorolt hatásairól. Ismeretes, hogy bizonyos C. raciborskii izolátumok toxikusnak bizonyultak mind sejtkultúrán, mind egereken végzett kísérletek esetében (Fastner és mtsai., 2003), annak ellenére hogy a faj, eddigi ismereteink szerint ismert toxint nem termelt. Munkánk során arra is fényt kívántunk deríteni miként játszódik le a kromoszómák kialakulása, milyen szerkezetbeli változások figyelhetők meg a kromatinpreparátumokon, milyen változást indukálnak a cianotoxinok illetve cianobakteriális kivonatok a kromatin kondenzálódás folyamatára. Továbbá ismeretes, hogy a cianotoxinok jelentősen megváltoztatják a sejtváz alkotóinak felépítését, illetve a membrán permeabilitását, munkánkban ezen paramétereket is monitoroztuk mind cianotoxinok, mind cianobakteriális kivonatok vizsgálata során. A munkánk célkitűzei az alábbi kérdések tisztázása volt:

- A kromatinállomány kondenzálódásának folyamata során megkülönböztethetőek-e az egyes morfológiai állapotok, illetve ez hogyan tükröződik a sejtek, sejtmagok nagyságában, illetve a DNS mennyiségben?
- A cilindrospermopszin, a mikrocisztin-LR, a bizonyítottan cilindrospermopszint termelő cianobaktériumtörzsből készült kivonat (AQS) és a balatoni *C. raciborskii* izolátumokból (ACT 9502, ACT 9503, ACT 9504, ACT 9505) készült kivonatok okoznak-e változást a CHO-K1 sejtek kromatin kondenzálódásának folyamatában?
- Milyen hatással vannak a cianotoxinok és kivonatok a CHO-K1 sejtek mikrotubuláris és mikrofilamentáris rendszerének szerveződésére, és ez hogyan nyilvánul meg?
- Milyen mértékű sejtkárosodást indukálnak a cianotoxinok és kivonatok, milyen mértékű laktát dehidrogenáz felszabadulást okoznak?
- Van-e összefüggés, illetve cianobaktériuma cianotoxinok extraktumok által indukált változások egyes aspektusai kromatinkondenzáció, citoszkeletális váz, és LDH a az enzimaktivitás - között?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A cianobaktériumok általános jellemzése

A cianobaktériumok a prokarióta élőlények csoportjába tartoznak, vagyis nem rendelkeznek valódi sejtmaggal. A legősibb fotoszintetizáló szervezetek, mintegy hárommilliárd évvel ezelőtt jelentek meg a világóceánban és kezdték meg oxigéntermelésükkel az akkor még oxigénmentes földi környezet átalakítását.

Sejtmembránjuk felépítésére az általános kettős foszfolipid réteg alkotta egységmembrán jellemző. Citoplazmájukat a Gram-negatív baktériumokra jellemző sejtfal határolja. А cianobaktériumok fotoszintetikus színanyagai tilakoid membránrendszerbe szerveződve a protoplazma széli részén helyezkednek el. A sejtek színe széles skálán mozog: a kékeszöldtől az ibolyásvörösig terjed. A klorofill-a mellett járulékos pigmentekkel is rendelkeznek (allofikocianin, fikocianin, fikoeritrin). A fotoszintetizáló élőlényekre jellemző PS I és PS II fotoszintetikus komplexekkel rendelkeznek. A környezet fényviszonyaihoz a pigmentjeik arányainak változtatásával képesek alkalmazkodni. (Bryant, 1994).

A megfelelő fényellátottság biztosítását szolgálják a gázvakuólumok. Ezek a gázzal telt vezikulumok a sejtek megfelelő fajsúlyának szabályozását biztosítják. A vezikulumok térfogata környezeti hatásokra változhat és ezáltal biztosítja az adott cianobaktérium megváltozott környezeti tényezőhöz való alkalmazkodását (Porat és mtsai., 2001).

A protoplazmában elhelyezkedő karboxiszómák a széndioxid felvételében játszanak fontos szerepet, a ribulóz- 1,5 biszfoszfát karboxilázt

tartalmazzák. Elektronmikroszkópos képeken zárványként jelennek meg a tápanyagok és anyagcsere termékek raktározására szolgáló képletek: a zsírcseppek, polifoszfát testek és a cianoficin szemcsék (Fay és Van Baalen, 1987).

Egyes cianobaktérium fajok (Anabaena, Nostoc sp., Cylindrospermopsis sp.) képesek a légköri nitrogén megkötésére. A nitrogénmolekulát a nitrogenáz enzimük segítségével alakítják át ammóniummá. A cianobaktériumoknál megfigyelhetőek a már fentebb említett cianoficin szemcsék, melyek nitrogén raktárként funkcionálnak (Chorus és Bartam, 1999). Bizonyos cianobaktérium csoportokra (Nostocales sp., Cylindrospermopsis sp.) jellemző az akinéta képzés. Az akinéta spóraanalóg képlet, jelentős tápanyagraktárral rendelkezik. Egyes fonalas cianobaktériumok környezeti stressz hatására képesek úgynevezett hormogóniumot képezni. Ez egy másik típusú aszexuális szaporító képlet (Fay és Van Baalen., 1987). Az egysejtes felépítéssel rendelkezők szaporodhatnak úgy, hogy az utódsejtek leválnak az anyasejt meghatározott részéről, vagy az anyasejt sok leánysejtté fragmentálódik. А cianobaktériumok tengerekben és édesvizekben, így a Balatonban is elterjedtek, gyakoriak és néha tömegesen forulnak elő.

2.2. A Balaton cianobaktérium világa

A Balaton alapvető vízminőségi problémáját az utóbbi évtizedekben a vízben lebegő mikroszkopikus algák túlzott mértékű elszaporodása jelentette. A Balaton vízminősége szempontjából nemcsak az jelentette a gondot, hogy az algásodás mértéke a nyári hónapokban érte el maximumát,

hanem tovább fokozta a bajt, hogy ekkor a cianobaktériumok voltak az uralkodóak. A cianobaktérium toxinok nemcsak a vízi élővilágra hatnak, hanem az emberi szervezetre is veszélyesek lehetnek (Codd és mtsai., 1999).

Az eutrofizáció során a vízben lévő foszfor és nitrogén túl nagy mennyisége a víz algásodásához vezet. Ennek nyomon követése, okainak feltárása, az algásodás okozta vízminőség romlás felismerése és a védekezés módjának meghatározása megköveteli a fitoplankton mennyiségi és minőségi viszonyainak pontos megismerését és szabatos leírását. A Balaton nemcsak üdülésre és fürdőzésre szolgál, hanem fontos ivóvízbázis is, partjain kilenc ivóvíz-kivételi mű üzemel. A potenciális toxintermelő cianobaktériumok tömeges elszaporodása a múlt század nyolcvanas éveiben súlyos veszélyt jelentett az ivóvíztermelés biztonságára. Emellett a balatoni cianobaktériumok jelentős része, valamint a Balaton jellegzetes eukarióta algái íz és szagrontó hatású vegyületeket is termeltek (Németh és Vörös, 1986). A mérsékelt égövön, így a Balaton esetében is a leggyakrabban nagyobb tömegben előforduló algák: a cianobaktériumok (Cyanobacteria), a kovamoszatok (Bacillariophyta) és a zöldalgák (Chlorophyta) törzseiből kerülnek ki. A Balaton uralkodó cianobaktérium fajai képesek a légköri Általános molekuláris nitrogén megkötésére. tapasztalat. hogy а cianobaktérium tömegprodukciók kialakulása szorosan összefügg elsősorban a tápanyagterheléssel, illetve az időjárással és ezen belül is a vízhőmérséklet alakulásával. Az egyes évek meteorológiai különbségei döntő szerepet játszanak abban, hogy azonos külső tápanyagterhelés mellett a tó algásodottságának mértéke egyik évről a másikra akár két-háromszoros különbséget mutathat.

A Balatonban számos cianobaktérium faj jelenlétét kimutatták. Istvánffy 1897-ben 109 algafaj, köztük öt cianobaktérium taxon jelenlétét

írta le a tó nyílt vízéből. Az uralkodó algák közül az *Aphanizomenon flosaquae* fonalas heterocisztás cianobaktériumot említi meg. Későbbi tanulmányokban már 13 planktonikus heterocisztás N₂-kötő cianobaktérium jelenlétét írták le, melyek az *Anabaena* és az *Aphanizomenon* nemzetségbe tartoztak (Entz és mtsai., 1937; Kol, 1938; Tamás, 1954; 1959). A hatvanas évek végén felgyorsult eutrofizálódással párhuzamosan az eukarióta algák visszaszorulása a cianobaktériumok előretörése és újabb fajok megjelenése figyelhető meg, mint például a *Rhaphidiopsis mediterranea*, *Anabaenopsis elenkini* (Tamás, 1974; Hegewald és mtsai., 1975). A hetvenes évek közepétől a nyári vízvirágzások, vízelszíneződések rendszeressé váltak a tó nyugati felében (Vörös, 1980; Vörös és mtsai., 1983; G.-Tóth és Padisák, 1986).

A Balaton algaflórájában lényeges változás a 70-es évek második felében következett be. 1978-ban észlelték először az *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz.) Elenk. mostani nevén *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenayya et Subba Raju heterocisztás N2-kötő cianobaktérium (*C. raciborskii*) fonalait a Balaton vizében (Oláh és mtsai., 1981). 1979 nyarára e faj biomasszája már kétszeresen felülmúlta az eddig uralkodó *Aphanizomemon flos-aquae*-t a tó Keszthelyi-medencéjében (Vörös és mtsai., 1983), majd három évvel később már az egész tóban egyeduralkodóvá vált (Vörös és mtsai., 1983; Padisák és mtsai., 1984). Az eddigi legsúlyosabb algaprodukció idején 1994-ben, a Balaton víztömege gyakorlatilag ezen faj monokultúrájává vált, a fitoplankton több, mint 90%át tette ki (Présing és mtsai., 1996).

A *C. raciborskii* ma is tagja a tó algaflórájának, a nyári nitrogénkötő cianobaktérium együttesekben rendszeresen megjelenik Egyeduralkodó szerepe megszűnőben látszik, más fonalas cianobaktérium fajokkal, mint az

Aphanizomenon gracile és Aphanizomenon isssatchenkoi együtt alkotja a nyári biomassza maximumokat.

A cianobaktériumok toxintermelése nem állandó, fajra jellemző tulajdonság, előfordul, hogy ugyanazon faj populációjának toxintermelése egy adott tóban térben és időben is erőteljesen változik. Egyazon faj különböző populációi eltérő mértékű toxicitást mutathatnak, és gyakran előfordulnak toxint egyáltalán nem termelő törzsek is (Fastner és mtsai., 2003).

A Balatonban, illetve elsősorban a Kis-Balaton területén esetenként tömegesen elszaporodó *Aphanizomenon flos-aquae, Anabaena aphanizomenoides, Cylindrospermopsis raciborskii*, valamint *Microcystis aeruginosa* fajok tömegtenyészetéből készített kivonatok toxicitását különböző halfajokon, vándorsáskán, valamint egértesztben mutatták ki (Bernard és mtsai., 2003; Hiripi és mtsai., 1998). A későbbiek során szerencsére bebizonyosodott, hogy a Balatonból izolált *C. raciborskii* nem termeli a cilindrospermopszint. Mivel ezek a cianobaktériumok, könnyen elszaporodnak és esetlegesen toxikusak is lehetnek, célszerű folyamatos monitorozásuk.

2.3. A cianotoxinokról

Számos cianobaktérium fajról kimutatták, hogy toxintermelésre képesek. Az első hivatalos publikáció a toxikus vízvirágzásokról 1878-ban jelent meg (Francis, 1878), melyben egy *Nostoc sp.* cianobaktériumfajt tesznek felelőssé haszonállatok elhullásáért. Azóta is számos publikáció jelent meg a cianobaktériumok által kiváltott toxikus vízvirágzásokról a

Föld különböző részein, mint például Dél-Amerikában, Izraelben, Ázsiában (Li és mtsai., 2001; Azevedo és mtsai., 1994, Banker és mtsai., 1997).

Számos tudományos közleményben számoltak be a cianobakteriális (korábbi nevén kékalga) toxinok egészségre gyakorolt hatásairól. A környezetre veszélyes túlszaporodásukat számos tényező elősegítheti, így a tápanyag ellátottság, hőmérséklet és a megvilágítás időtartamának növekedése. A cianobaktériumok által termelt toxinok nemcsak a vízi élőlényekre, hanem gazdaságilag fontos haszonállatokra, sőt, akár az veszélyt jelenthetnek. А emberre is természetes vizekben а cianobaktériumok elszaporodása (ún. vízvirágzás) ember esetében gastrointestinális megbetegedéseket, bőrgyulladást, vese megbetegedéseket és allergiás reakciókat válthat ki. 1996-ban széles publicitást kapott 76 brazil vesebetegnek a halála, amit a vese dialízishez használt cianotoxinnal szennyezett víz okozott (Jochimsen és mtsai., 1998).

A cianotoxinok hatásai meglehetősen változatosak. Vannak köztük hepatotoxikus (mikrocisztinek, nodularin), citotoxikus (cilindrospermopszin), idegmérgek (anatoxin-a, szaxitoxinok), dermatotoxinok (lyngbyatoxin és aplysiatoxin) és mások gastrointestinális problémákat okoznak (Chorus és Bartam, 1999). Kémiai szerkezetük szerint három nagy csoportra oszthatjuk a cianotoxinokat: ciklikus peptidek, alkaloidok és lipopoliszacharidok (LPS) (Chorus és Bartam., 1999). A mikrocisztinekről és a cilindrospermopszinról a 2.3.1. és 2.3.2. pontban szólunk részletesebben.

A cianotoxinok elsősorban a sejtek lízisét, a membrán degradációját követően jutnak a környezetbe. Egészséges, a növekedés logaritmikus fázisában lévő tenyészetben az extracelluláris toxintartalom alig 10-20 %-a az össztoxinmennyiségnek. A vizek toxintartalmának mennyiségében több

százszoros, sőt, akár több ezerszeres különbség is lehet a vízvirágzás kezdete és vége között. A cianotoxinok kimutatására jelenleg biológiai, kémiai és immunológiai módszereket használnak.

2.3.1. Hepatotoxikus ciklikus peptid típusú toxinok: mikrocisztinek és nodularinok

A hepatotoxinokat termelő cianobaktériumok közül legismertebbek a *Microcytis* és *Nodularia* fajok. Napjainkig a mikrocisztinek több mint 60 variánsát írták le (Gupta és mtsai., 2003). A különböző mikrocisztinek toxicitása nagyon hasonló. A legtoxikusabb mikrocisztineknek az LC_{50} értéke (egér intraperitoneális kezelése esetén) 50-100 µg/testtömeg kg. A mikrocisztinek általános felépítésére jellemző, hogy ciklikus peptid típusú vegyületek (1. ábra). Egy speciális aminosav, az Adda, esszenciális a toxinok biológiai aktivitásához.

Az egyik legjobban ismert mikrocisztin, a mikrocisztin-LR (MC-LR). A MC-LR kovalensen kötődik a protein foszfatáz 1 (PP1) és a protein foszfatáz 2A-hoz (PP2A) is, előbbinél a 273-as számú ciszteinhez, utóbbinál a 266-os cisztein aminosavhoz. Az MC-LR direkt módon gátolja a PP2A metilálását azáltal, hogy bekötődik a C alegység karboxil végéhez, így a metiltranszferáz nem tud hozzáférni a foszfatázhoz. A mikrocisztin krónikus dózisa általános hepatocita degenerációt, progresszív fibrózist, leukocita beszűrődést eredményez. Arról is beszámoltak, hogy mikrocisztin tartalmú vizet fogyasztó embereknél megnőtt a májdaganat megjelenésének gyakorisága (Yu., 1995; Codd és mtsai., 1999). MC-LR gátolja a PP1 és PP2A-t már 0.1 -1.0 nM koncentrációban (MacKintosh és mtsai., 1990),

viszont nem gátolja a protein foszfatáz 2C-t (PP2C) és nincs hatással a protein kináz C-re (PKC) és a c-AMP-dependens kinázra (PKA) sem (Honkanen és mtsai., 1990).



1. ábra A mikrocisztin –LR szerkezeti képlete (Fewer és mtsai., 2007) 1. aminosav: D-alanin, 2 aminósav: variábilis aminosav, jelen esetben L-leucin, 3. aminosav: D-Metil-aszpartát, 4. aminonsav: variábilis aminosav, jelen esetben L-arginin, 5. aminosav: 3-amino- 9-metoxi-2-6-8-trimetil-10-fenildeka-4-6-dienoiksav, 6. aminosav: D-glutaminsav, 7. aminosav: N-metildehidroalanin

Ezeknek a toxinoknak a bioakkumulációját tengeri élőlényekben (halak, puhatestűek és zooplankton) is leírták, mely arra enged következtetni, hogy ezen állatok elfogyasztása is kiválthat humán megbetegedéseket (Amorim és Vasconcelos, 1999; Cazenave és mtsai., 2005; Engstrom-Ost és mtsai., 2002; Mohamed és mtsai., 2003). Laboratóriumi állatokon daganatindukáló hatásukat is kimutatták (Nishiwaki- Matsushima és mtsai., 1992). A mikrocisztinek és a hozzájuk hasonló protein foszfatáz inhibitorok hasznosak a fehérje foszforiláció és a sejten belüli jelátvitel tanulmányozásában.

Az ebbe a csoportba sorolt másik hasonló szerkezetű peptid a nodularin, az őt termelő *Nodularia spumigena* cianobaktériumról nevezték el (2. ábra). E vegyületnek is izolálták már több szerkezeti variánsát a Föld különböző területein pl.: Ausztráliában (Runnegar és mtsai., 1988), Új Zélandon (Carmichael és mtsai., 1988; Rinehart és mtsai., 1988) és a Balti-tengerben (Eriksson és mtsai., 1988; Sivonen és mtsai., 1989; Sandström és mtsai., 1990).



2. ábra A nodularin szerkezeti képlete, Forrás: http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/lehtimaki/ch1.htm)

A toxinok protein foszfatázokhoz való kötődésében az 5. és 6. számú aminosavaknak van szerepe. Ha a ciklikus szerkezet valamilyen módon lineárissá válik, akkor az a toxicitás elvesztését vonja maga után (Choi és mtsai., 1993).



2.3.2. Citotoxikus alkaloidok: cilindrospermopszin

A cilindrospermopsin egy szulfát csoportot tartalmazó ciklikus guanidin alkaloid (molekulatömege: 415 Da), melyet eddigi ismereteink szerint a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Hawkins és mtsai., 1997), az *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker és mtsai., 1997), az *Umezakia natans* (Harada és mtsai., 1994), a *Raphidiopsis curvata* (Li és mtsai., 2001), az *Anabaena bergii* (Schembri és mtsai., 2001; Fergusson és Saint, 2003), az *Aphanizomenon flos-aquae* (Preussel és mtsai., 2006), az *Anabaena lapponica* (Spoof és mtsai., 2006) és a *Lyngbya wollei* (Seifert és mtsai., 2007) cianobaktérium fajok termelnek (3. ábra).



3. ábra A cilindrospermopszin szerkezeti képlete. Forrás:http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Cylindrospermopsin.png

A cilindrospermopszin sötétben stabilabb, mint fényben. magas hőmérsékleten (50°C) viszont lassú bomlása figyelhető meg (Chiswell és mtsai., 1999). Napfényben, pigmentek (fikobiliproteinek) jelenlétében relatív gyorsan bomlik, 2-3 nap alatt a kiindulási mennyiség 90%-a degradálódik.

A tisztított cilindrospermopszin gerinces állatokon végzett kísérletek szerint elsősorban a májra hat, de kóros elváltozásokat idéz elő a vesében, a

lépben, a timuszban és a szívben is (Runnegar és mtsai., 1994, 1995; Falconer és mtsai., 1999; Azevedo és mtsai., 2002). Valószínűleg ez a toxin volt felelős az ausztráliai Észak Queensland-i Palm Islandon élő embereknél megfigyelt hepatoenteritises megbetegedések számának megnövekedéséért 1979-ben (Norris és mtsai., 2002). Kimutatták a cianotoxin neuronokon kifejtett hatását is (Kiss és mtsai., 2002), sőt genotoxikus voltát is leírták (Shen és mtsai., 2002). A cianotoxin bioakkumulációjának jelentős irodalma van: elsősorban kagylók, rákok esetében írták le. (Saker és Eaglesham, 1999; Saker és mtsai., 2004; Kankaanpaa és mtsai., 2005). A cilindrospermopszin vizi gerincesekre kifejtett hatásáról kevesebb adatot találunk az irodalomban, de az eredmények arra utalnak, hogy a mérgezési tünetek hasonlóak az emlősökön végzett laboratóriumi kísérletekben tapasztalt mérgezésekhez. A táplálkozás során a szervezetbe kerülő cilindrospermopszint termelő cianobaktériumok, vagy maga a toxin, a májsejtek nekrózisát okozza, amit az azt fogyasztó halak pusztulása követ. Az érzékenységben nagy eltérések mutatkoznak a különböző fajok között. A cilindrospermopszin károsíthatja halak esetében a májon kívül a szívet, a vesét és a kopoltyút is (Chorus és Bartam, 1999).

Az irodalomban találunk arra vonatkozó adatokat, hogy gátolja a fehérjeszintézist állati (Froscio és mtsai., 2003) és növényi sejtekben egyaránt (Metcalf és mtsai., 2004). A cilindrospermopszin ismert protein szintézis gátlásának lehetséges módjai: egy aktivált metabolitja kötődik a DNS-hez vagy RNS-hez és ezáltal megszakítja a transzkripciót vagy transzlációt. A cilindrospermopszin pontos molekuláris hatásmechanizmusa mindezidáig még nem tisztázott, további kutatások tárgyát képezi.

2.4. Az eukarióta sejtciklus és szabályozása

Egy átlagos emlős sejtciklus hossza - vagyis amíg egy sejtből két utódsejt létrejön - 18-20 órára tehető, de természetesen vannak extrém esetek is, ahol a sejtek osztódásra képtelenek. Például az idegsejtek természetes körülmények között nem képesek osztódni. A sejtciklus szakaszai szigorú sorrendben követik egymást, természetesen ellenőrzési pontok közbeiktatásával (4.A ábra). Bonyolult rendszerek biztosítják a sejtosztódás helyes megtörténését. Molekuláris biológiai vizsgálatok rámutattak arra, hogy a sejtciklus szigorúan kapcsolható bizonyos anyagok (ciklinek, mitózist elősegítő faktor, illetve ciklin dependens kinázok (cdk)) koncentrációjának oszcillálásához (Norel és Agur, 1991). A cdk mennyisége nagyjából állandó a sejtciklus során, a szabályozást a különböző ciklinek mennyisége biztosítja (10.B ábra). A ciklinek és a cdk-ok kapcsolódása szabályozza az egyes sejtciklusbeli lépéseket. A ciklin-cdk komplex teljes aktivációja csak egy foszforilációs lépés után lesz teljes, melyet a cdkaktiváló kináz végez. Egy másik ciklin-cdk komplexhez kapcsolódó kináz, a cdk gátló fehérje (cdkI) csökkenti a komplex aktivitását.

Az eukarióta sejtciklus első fázisa a G1 (Gap1) fázis, a sejtek első nyugalmi fázisa. Ekkor a sejt ellenőrzi belső és külső környezetét, hogy az állapota megfelelő-e és minden előkészületi lépés megtörtént-e, hogy a következő, S fázisba léphessen. A G1 szakasz hosszát a külső környezet és extracelluáris szignálok jelentősen befolyásolják. A G1 ciklinek (gerincesekben ciklin D fehérje) elősegítik a G1/S ciklinek aktivitását, mely a sejtek Start ponton való áthaladását szabályozza.



4. ábra A) A sejtciklus szakaszai, fontosabb történések B) A ciklinek megoszlása a sejtciklus során

A sejtek késői G1 szakaszából az S fázisba kerüléséhez a megnövekedett G1/S ciklinek (gerincesekben ez a ciklin E fehérje) cdk-hoz való kötődése szükséges. Ezen ciklinek mennyisége az S fázisban lecsökken, helyettük az S ciklinek (gerincesekben ciklin A fehérje) mennyisége fog megnövekedni (Alberts és mtsai, 2008).

Az S (szintézis) fázisban a sejt DNS-ének megkettőződése zajlik. A folyamata több helyen (origók) indul meg egyszerre, ide kötődnek az iniciációs fehérjék. A DNS megkettőződését, vagyis a replikációt egy multienzim komplex katalizálja, a szintézis szemikonzervatív, tehát a keletkező DNS egy régi és egy új szálból áll. A DNS hélix ATP energiát

igénylő szétcsavarása az origóknál történik a helikáz enzim segítségével, majd kialakul a replikációs villa. A replikációs multienzim komplex legfontosabb tagjai a DNS polimerázok, amelyek magát a szintézist katalizálják (az energiát a beépülő deoxiribonukleozid trifoszfát szubsztrátokról lehasadó β és γ foszfátok makroerg savanhidrid kötése biztosítja), de csak egy már meglévő nukleinsav láncot képesek elongálni 5' - 3' irányban). A DNS szintézis iniciálása a primáz enzim segítségével történik. Létrejön egy RNS primer, amihez a DNS polimeráz már hozzá tudja építeni a deoxiribonukleozid monofoszfátokat. A vezető szál szintézise folyamatos, mivel a szintézis 5'-3' iránya megfelel a replikációs villa haladási irányának. A lemaradó szálon a replikációs villa haladási irányával ellentétesen halad a DNS polimeráz, ezért ezen a szálon a szintézis szakaszosan, ún. Okazaki fragmentumok formájában történik. Az Okazaki fragmensekről lehasad az RNS primer, a repair polimeráz bepótolja a hiányzó nukleotidokat, az érett, egymással érintkező fragmenseket pedig a DNS ligáz kapcsolja össze. A lemaradó szálon az utolsó Okazaki fragmens szintézise többnyire nem a templát szál legvégéről indul, ezért a másolat rövidebb lesz az eredetinél (Bánfalvi, 2004). Ezzel magyarázható a telomer végek "kopása" és az egyik öregedési elmélet. Az S ciklinek mennyisége rögtön a sejt "start" ellenőrzési ponton való áthaladása után már stimulálja a DNS megkettőződését és szintje a mitózisig emelkedett marad, ahol még néhány korai mitótikus esemény szabályozásában is részt vesz.

A G2 szakaszban ismét nyugalmi állapotban van a sejt és ellenőrzi az intracelluláris (DNS sértetlensége, megkettőződés hibátlansága) illetve a sejten kivüli térből érkező szignálokat és felkészül a mitózisba való belépésre. Az S ciklinek mennyisége továbbra is emelkedett. A sejt a mitózisba csak a G2/M ellenőrzési ponton való áthaladás után léphet. Az

ellenőrzési ponton való áthaladás után megemelkedik az M ciklinek mennyisége (gerincesekben ciklin B fehérje) majd a metafázis-anafázis elérve mennyisége ismét lecsökken. Ez a három fázis (G1, S, G2) alkotja az interfázist (Bánfalvi, 2004).

A következő rövid szakasz, amikor a tulajdonképpeni sejtosztódás megtörténik, a mitózis fázisa. A mitózis alatt a sejt DNS-e kromoszóma formájában kettéosztódik. Ez a folyamat több részre tagolható. A mitózisba való átmenet során kialakul a mitózis promoting faktor (MPF) mely egy Cdk és egy S ciklin komplexe. Az MPF aktivációja egy foszfatáz segítségével történik, mely lehasítja a korábban a gátló kináz által felrakott foszfát csoportot. Az aktiv MPF foszforilálja a lamina fibroza A, B és C laminjait és ez a sejtmaghártya lebomlását fogja kiváltania. A MPF működése az anafázis elősegítő komplex (APC) hatására kezd degradálódni, majd megszűnni a mitózis anafázisának végén. A profázisban a sejtmag kromatin állományából kialakulnak a kromoszómák a DNS tekercselődésével és további hajtogatódásával. A replikáció következtében minden kromoszóma két kromatidából áll. A citoplazmában a centroszóma (sejtközpont) megkettőződik és a sejt két ellentétes pólusára kezd vándorolni, megkezdődik a mitotikus orsók kialakulása. Kialakul két új mikrotubulus rendszer, az asztrális és a poláris mikrotubulusok. A kinetokor mikrotubulusok a kromoszómák centromer régiójában elhelyezkedő kinetokor fehérjékhez kapcsolódnak. A metafázisban a kromoszómák a centroszómák irányából hozzájuk kapcsolódó kinetokor mikrotubulusok segítségével a sejt egyenlítői síkjába rendeződnek. A metafázis és anafázis között taláható a harmadik ellenőrzési pont. Ennek szabályozó kulcsmolekulája az APC, mely egy ubiquitin ligáz. Az aktív APC katalizálja a szekurin nevű fehérje destrukcióját, mely egy proteázt (szeparáz) fog

aktiválni, mely a kohezin fehérjék hasítása révén a testvér kromoszómák elválását fogja eredményezni. APC másik funkciója az S és M ciklinek lebontása, ami a M-cdk komplex inaktivációját fogja okozni. A cdk target fehérjéinek defoszforilálása nelkülözhetetlen az Μ fázis teljes végbemeneteléhez, beleértve a citokinézist is. Az APC egészen a G1 fázisig aktív marad, működését a megnövekedő G1/S ciklinek aktivációja fogja kikapcsolni (Alberts és mtsai., 2008). Az APC központi szerepet játszik a kromatin kondenzáció folyamatának "karbantartásában", különösen a G1 és G0 szakaszokban, ahol a H3 hisztonok foszforilációjában vesz részt az aurora A kináz lebontása révén (Alberts és mtasi., 2008). Az anafázisban a kromoszómák kettéválnak a kinetokor mikrotubulusok közremüködésével, majd a poláris mikrotubulusok révén a sejtközpontok felé vándorolnak. A mitózis utolsó szakaszában a telofázisban eltűnnek a kinetokor mikrotubulusok, a két pólusra vándorolt kromatidák körül megjelenik a sejtmaghártya. A kromoszómák dekondenzációjával újra kialakul a kromatinállomány és kialakulnak a sejtmagvacskák.

A citokinéziskor a sejt közepén befűződés képződik a kontraktilis gyűrű révén, ami egyre szűkül. A poláris mikrotubulusok maradványából létrejön a középtest majd végül a sejt citoplazmája teljesen kettéválik és az interfázisra jellemző mikrotubulus rendszer alakul ki.

A sejtek osztódásához a növekedési faktorok nélkülözhetetlenek melyek plazmamembrán receptorokon keresztül fejtik ki a hatásukat - de ezen kívül szükséges még szabad felszín is a letapadásukhoz. Sejtkultúrák kialakítása során fontos a megfelelő kiindulási sejtszám meghatározása is, mivel magas sejtszám esetén kontakt gátlás lép fel. A sejtek osztódását szabályozzák még a sejtosztódást serkentő (protoonkogének) és gátló (tumor szuppresszor) gének is, melyeknek a normális sejtciklus lezajlásához

egyensúlyban kell lenniük. Szintén fontos szerepe van még a Ras fehérjéknek, melyek aktivált állapotban egy szerin/treonin foszforilációs kaszkádot indítanak be, melynek a mitogén aktivátor protein kinázok (MAPK) a szereplői. Ezek további transzkripciós faktorokat aktiválhatnak, melyek előbb a korai majd a késői gének átírását serkentik. A protein foszfatázok fontos szabályzói a MAPK-oknak.

2.5. A kromatinállomány szerveződési fázisai

2.5.1. Az interfázisban lévő sejt kromatinállományának struktúrája

A hosszú DNS-láncnak (ember esetében több mint 1 méter) ahhoz, hogy elférjen egy 5-10 µm-es sejtmagba, nagyon pontosan és precízen kell szerveződni, mindamellett biztosítania kell a transzkripció, replikáció, a rekombináció vagy éppen a repair számára az adott DNS szakaszhoz való hozzáférhetőséget. Ezt biztosítja eukarióta sejtekben a kromatin struktúra (Ehrenhofer-Murray, 2004).

A kromoszómákba való rendeződés több szinten keresztül valósul meg, mindegyik egy-egy jellegzetes struktúrával jellemezhető.

A kromatin legkisebb szerveződési egysége a nukleoszóma. Egy nukleoszóma átlagosan 200 bp hosszúságú DNS szakaszból és 5 hiszton fehérjéből: H1, H2A, H2B, H3, H4 áll. A nukleoszóma magját az úgynevezett core adja, melyben 146 bp-nyi DNS tekeredik fel egy henger alakú fehérjemagra, melyet a (H2A)₂, (H2B)₂, (H3)₂, (H4)₂ hiszton oktamer képez (Luger, 2003). A hisztonok tandem elhelyezkedésű génekről íródnak át. A H1 hiszton fehérje a hiszton oktamerek közötti DNS-hez kötődik és rögzíti a DNS-t az oktetthez, valamint szerepet játszik a magasabb rendű kromatinszerkezet kialakításában (Wolfee, 1995). A hisztonok pozitív töltésű lizin és arginin aminosavai és a DNS negatív foszfátcsoportjai közötti elektrosztatikus kölcsönhatás a nukleoszóma stabilitásának lényeges tényezője. Az így létrejött nukleoszóma 11 nm átmérőjű, magassága 5,7 nm. Ez a gyöngyfüzér szerkezet már 6-7 szeres tömörödést biztosít. A nukleoszómák a DNS valamely pontjához viszonyítva vagy rögzített vagy random elrendeződést mutatnak. A genom azon részén alakul ki a rögzített elrendeződés, ahol 10bp-onként rövid AT gazdag szakaszok ismétlődnek periodikusan, és ez nagyfokú hajlíthatóságot biztosít. E felfogás szerint a nukleoszómák térbeli elrendeződését végső soron a bázisszekvencia határozná meg.

A nukleoszómális struktúrára ún. magasabbrendű kromatinstruktúrák épülnek. Következő szint a kromatinrost állapot, mely már közel 40-szeres tömörödést jelent (Bánfalvi, 2008).

A 30 nm átmérőjű fibrillum további csavarodásával jön létre az úgynevezett bolyhos fonal, mely már 400-800 szoros kompaktságot biztosít. Ezt a tömörödést fehérjék segítik, mint például a kondenzáló komplex tagjai és a topoizomeráz II (Swedlow és Hirano, 2003). Ezek a fibrillumok a magmátrixhoz kötődnek, kb 40-100 kb-onként, így ezzel egy hurkos szerkezetet alakítanak ki. Ezen enzimek segítségével kondenzálódik a kromatinállomány a fénymikroszkóposan is megfigyelhető metafázisos kromoszómákká.

A gének átírását elősegítő DNS szakaszok (enhanszerek) felfedezése után az a nézet alakult ki, hogy egy-egy hurok nemcsak strukturális, hanem funcionális egység is, mivel a közös szabályozás alatt álló gének egy hurkon belül helyezkednek el, vagyis a kromatinhurkok meghatározott DNS szekvenciáknál kötődnek a nukleáris mátrixhoz. A nukleoszómák tömör szerkezete akadályozza a transzkripciót katalizáló RNS polimerázok

működését. Enzimek és ún. kromatin-remodeling fehérjék kromatin szerkezetet módosító hatásával válik a DNS átírhatóvá. A protimiozin α A lazulást a hisztonok acetilációja indítja meg. Az acetiláció folyamán a hisztonfehérjék végein elhelyezkedő, pozitív töltésű lizin aminosavakra egy-egy ecetsavmolekula épül rá, így azok elveszítik pozitív töltéseiket, és a DNS-ről leválnak.

A DNS struktúra, további tömörödése során nem hiszton fehérjékhez kötődik, a nukleáris mátrixra csavarodik és kialakítják a kromatidákat, kromoszómákat. A kromoszómák tízezerszeres tömörödést biztosítanak. Egy másik kromoszóma szerveződési elmélet szerint plektonémásan önmagára tekeredve 6 hurokból álló rozetták jönnek létre és ezek alkotják a kromatidákat. A feltekeredés okozta kromatin kondenzálás a metafázisos kromoszómák formálódásával éri el maximumát.

Az interfázisos kromoszómák különböző régióiban eltérő a DNS kompaktsága. Az eukarióta genomban két különböző típusú kromatinszerkezet: az eukromatin és a heterokromatin figyelhető meg. A proteineket kódoló strukúrális gének elsősorban az eukromatinban találhatóak. A heterokromatin döntő részben a centromer körül helyezkedik el, a sejtciklus egész időtartama alatt kondenzált állapotban van. A heterokromatinnak két fajtája van: a konstitutív – pl az egyik női X kromoszóma Barr testté alakulása, illetve a fakultatív - a sejt funkcionális állapotának megfelelően változó, reverzibilis formája. In situ hibridizációs kísérletek szerint az egyes kromoszómákat alkotó egy-egy DNS molekula az interfázisos magban önálló területet foglal el. Az interfázisos kromoszómák több ponton a laminához rögzülnek, ami relatív helyzetüket a magmembrán és a lamina széteséséig meghatározza.

2.5.2. A metafázisos kromoszóma szerkezete

Két testvérkromatidából épül fel, melyet a repetitív DNS szakaszokból álló centromer kapcsol össze. Ennek bizonyos szekvenciáihoz specifikusan kapcsolódó proteinek kötődnek, kialakítva a kinetokort, mitotikus orsó mikrotubulusai kapcsolódnak. melyhez a Néhány kromoszómán másodlagos befűződés jelzi a riboszómális gének helyét, ezek az ún. nukleolusz organizátor régiók. A kromoszómák különböző festési eljárással jellemző sávozottságot mutatnak, melyek által egymástól megkülönböztethetőek. A Q sávokat aquinacrin, a G sávokat a gyenge proteolitikus kezelés utáni Giemsa festés, az R sávozódást a forró alkalikus kezelés után kapott Giemsa festés után láthatjuk. A kromatidák a szatellita DNS-t tartalmazó centromér régiónál kapcsolódnak össze, melyet a kohezin nevű fehérje tart össze (S fázis). Ennek lehasadása után válnak szét az anafázisban a kromatidák. A centromér által két karra osztott kromoszóma végek a telomérák.

2.6. A sejtek citoszkeletális komponensei

Az eukarióta sejt belső váza egy háromdimenziós hálózat, amely fehérje filamentumokból és tubulusokból áll. Ez a belső szerkezeti váz tartja helyükön a sejtorganellumokat és határozza meg a sejt alakját. Ez a rendszer felelős a sejten belüli anyagtranszportért és ez irányítja a sejt egészének mozgását is.

A citoszkeletont három alrendszer alkotja: a mikrofilamentumok, az intermedier filamentumok és a mikrotubulusok rendszere. Mindhárom struktúra kifejezetten dinamikus, tehát állandóan keletkezik és elbomlik és

állandó kapcsolatot tartanak fenn más fehérjékkel. Részletesebben csak az általam vizsgált alkotókat ismertetném.



5. ábra A citoszkeleton megjelenése a sejtekben: Zöld színnel a mikrotubuláris rendszer (FITC-cel konjugált antitesttel történő festés), piros színnel a mikrofilamentáris rendszer látható (falloidinhez kötött TRITC-cel történő festés). A kék festés (DAPI festés) a sejtmagot mutatja.

2.6.1. A mikrofilamentumok

A mikrofilamentumok 43kD tömegű aktin fehérjéből álló fonalak. Az aktin a leggyakoribb fehérje a tipikus eukarióta sejtben: akár az össz fehérjemennyiségnek 15 %-át is kiteheti (5. ábra). Az aktin a simaizmok nem kollagén típusú fehérjéinek 30-50%-át adja. Két formája ismeretes a monomer "globuláris" G-aktin és a polimerizált filamentáris F-aktin. Evolúciós szempontból meglehetősen konzervatív polipeptid láncról van szó (Zafar és Sodja, 1983).

A G aktin négy alegységből (azaz négy elkülöníthető polipeptid láncból) épül fel és tartalmaz egy adenozin nukleotid (ATP) kötőhelyet (Estes és mtsai., 1992). Ha a G aktin ATP-t köt beindul a polimerizáció és létrejön a filamentáris szerkezetű F aktin. Amennyiben az F aktinról

hidrolizál az ATP, a filamentum depolimerizációja fog bekövetkezni. Az F aktin polaritással rendelkezik. Az aktin fehérjére jellemző folyamat a taposómalom mechanizmus, melynek során a filamentum (+) végén aktin monomerek épülnek be, mig a (-) végen az aktin monomerek leválása figyelhető meg, tehát maga a szál hossza a folyamat során jelentősen nem változik.

A sejtben az aktin szálakat különböző keresztkötő fehérjék (α aktinin, filamin) rendezik kötegekbe, illetve hálózatokba. Az aktin filamentum össze- és szétszerelésében különböző aktinkötő fehérjék vesznek részt: a gelszolin a citoszól gél és szól állapotok közti átmenetet befolyásolja, a kofilin a G aktin-ADP komplexhez kötődve gátolja az ADP/ATP kicserélődést, az aktin repolimerizációjának inhibícióját idézve elő, míg a profilin az aktin polimerizációját serkenti. A kis GTP-kötő fehérjék egyik családja a Rho fehérjék családja,szintén hatással van a sejtek aktin szerkezetére: a Rac fehérjék aktiválják a lamellipodium képződést, a Cdc42 fehérjék aktivációja segíti az aktin kötegekbe rendeződését és a fillopodiumok kiterjedését, míg a Rho proteinek a fokális adhéziók és a stressz rostok kialakulásást serkentik (Lewin és mtsai., 2007).

Az F-aktin specifikus jelzésére - a speciális antitesteken kívül - a fallotoxinok (falloidin és fallacidin) rendkívül alkalmasak. Ezen anyagok a gyilkos galócából (*Amanita phalloides*) nyerhetőek ki, biciklikus peptidek, melyek a globuláris aktinmonomerhez nem, hanem csak a polimerizált, fibrilláris aktinhoz kötődnek. A falloidin alkalmazása mellett szól az is, hogy nem gátolják az F-aktin motilitással kapcsolatos funkcióit (VanBuren és mtsai., 1998).

2.6.2. A mikrotubulusok

A mikrotubulusok spirálisan összekapcsolódó α és β tubulindimerekből épülnek fel (5. ábra). Minden sejtben nagy mennyiségben szintetizálódnak a sejtosztódás folyamatakor, ilyenkor fő szerepük a kromatidák illetve homológ kromoszómapárok а széthúzása az anafázisában. Feladatuk elsősorban a sejtszervecskék mozgatása. A folyamat alapját az képezi, hogy a mikrotubulusok polarizáltak, a (+) végen a tubulin molekulák folyamatos összekapcsolódása folyik, a másik, (-) végen pedig depolimerizáció történik. A (+) véghez fehérjékkel kapcsolódó vezikulum a tubulus felszínén spirális mozgással fokozatosan a másik véghez jut. A kromoszómák mozgatásánál ezt az elvet egyelőre nem sikerült bizonyítani, ezért feltételezik, hogy az egyik végükkel a sejtközponthoz kapcsolódó húzófonalak a szállító (vagyis a kromoszómák befűződésével kapcsolódó) végükön fokozatosan rövidülnek. A mikrotubulusok szintézisét bizonyos gyógyszerek pl. a kikericsben (Colchicum autumnalae) is előforduló kolchicinek gátolják, ezért ezeket a vegyületeket egyúttal a mitotikus osztódás gátló tényezőiként is számon tartják.

2.7. A tejsav dehidrogenáz alkalmazása citotoxicitási vizsgálatokban

A tejsavdehidrogenáz (LDH) valamennyi sejtben előforduló, tetramer szerkezetű molekula. Az anaerob glikolízis folyamatának utolsó lépését katalizálja: a piroszőlősavból L-tejsav termelődik a laktátdehidrogenáz hatására biológiai erjedés, metabolizmus vagy munkavégzés

során. Koncentrációja viszonylag állandó, mert képződésével azonos ütemben kerül lebontásra monokarboxilát-transzporterek és a szövetek oxidatív képessége miatt. Nyugalmi állapotban a vérben található tejsav koncentrációja 1-2 mmol/L, de intenzív fizikai munkavégzés következtében akár a 20 mmol/L-t is elérheti. A tejsav felhalmozódását az izmokban érzékelhetjük izomlázként.

Ötféle humán tejsav dehidrogenáz izoenzimet különböztetünk meg: LDH-1 (4H) – szív, mely tisztán szív (H=heart) típusú alegységekből áll, LDH-2 (3H1M) – retikuloendoteliális, LD-3 (2H2M) – tüdő, LDH-4 (1H3M) – vese és LDH-5 (4M) máj és harántcsikolt izoformákat. Utóbbi tisztán M (muscle) típusú alegységekből áll. Humán szérumban ennek százalékos megoszlása: LDH-1 : LDH-2 : LDH-3 : LDH-4 : LDH-5 = 20 : 34 : 23 : 12 : 11. Az izoenzimek arányának megváltozása különböző betegségek kórjelzője lehet. Emelkedést mérünk különböző májbetegségek, egyes anémia és szöveti károsodások esetében.

A citotoxicitási vizsgálatok széles körben használatosak az *in vitro* toxikológiai tanulmányokban. A LDH enzim aktivitás vizsgálat, a sejtproliferációs MTT-teszt és a neutrálvörös-teszt eljárás a legismertebbek, a sejt életképesség meghatározására, valamely toxikus anyaggal történő kezelés után (Fotakis és Timbrell, 2006)

Az LDH assay az extracelluláris médiumban lévő tejsav dehidrogenáz enzim aktivitásának mérésén alapul. Megbízható, gyors és egyszerűen kivitelezhető (Decker és Lohmann-Matthes, 1988). Széles körben használják, sokféle sejtvonalon pl.: HepG2 sejteknél (Dong és mtsai., 1998), PC 12 sejtek esetében (Satpute és mtsai., 2008), RBE-4 endothel sejteknél (Price és mtsai., 2006), de primer patkány kortikális neuronokon történő mérésre is van példa (Akasofu és mtsai., 2006).

A mérés elve a következő: a tejsavdehidrogenáz enzim (LDH) pH=7,5 pufferben NaCl és NADH (koenzim) jelenlétében katalizálja a piruvát átalakulását laktáttá. A NADH átalakulását NAD⁺ formára 340 nmen abszorbancia csökkenés kíséri. Az abszorbancia változás arányos a szérum tejsav dehidrogenáz aktivitásásával.
3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Anyagok

A kísérletekhez az alábbi vegyszereket és anyagokat használtuk: anti-β-tubulin (Sigma-Aldrich, C4585), phalloidin–FITC (Sigma-Aldrich, P5282), penicillin/streptomycin (Sigma), 1,4- diazobiciklo-2,2,2-oktán (Sigma), NADH (Sigma), piruvát (Sigma), Trish-HCl (Sigma), Hepes (Sigma), ditiotreitol (Sigma), Bradford reagens (Sigma, B6916), Triton X-100 (Sigma), 2,6 diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Braunschweig Chemie), dextrán T-150 (Pharmacia) F12/Ham médium, foetalis borjúszérum (FBS) (Invitrogen), nátrium azid (Reanal), magnézium-klorid (Spektrum 3D), Annexin-V FITC apoptosis detection kit (Roche-Boehringer-Mannheim), Mikrocisztin-LR, Cilindrospermopszin (Prof. Dr. Borbély György ajándéka).

3.2. A CHO-K1 sejtvonal jellemzése, a sejtkultúra fenntartása

Munkánk során a kínai hörcsög ovárium sejteket (CHO-K1, ATCC #CCL61) 37 fokon 5% CO₂ és 95% levegő vízgőzzel telített keverékében tenyésztettük, kitapadó kultúra formájában. A sejtek fenntartása F-12/Ham médiumban történt 5 %-os hőkezelt FBS és 100 U/ml penicillin/streptomycin (P4458) jelenlétében.

A sejteket a kísérletek elvégzése előtt 24 órával frissen passzáltuk. A kromatin állomány kondenzálódásával kapcsolatos kísérletekhez a CHO-K1 sejteket T sejttenyesztő edényekbe tettük, míg a citoszkeleton vizsgálatához, 4 lyukú plate-be helyezett 12 mm átmérőjű steril üveg

fedőlemezkékre. Az LDH enzimaktivitás vizsgálatokhoz a sejteket 1 x 10^5 en koncentrációban helyeztük 96 lyukú mikrotiter lemezre.

3.3. Cianobaktérium kivonatok készítése

A cianobaktériumok fél-folyamatos tenyésztését 16 literes üveg hengerben végeztük. A tenyészetet BG-11-es médiumban tartottuk fent (Rippka és mtsai., 1979). A C. raciborskii-hoz NaNO₃ mentes médiumot használtunk. Az alga kultúráinkat folyamatosan ellenőrzött körülmények között szaporítottuk 22±1 °C-on, 14:10 órás fény: sötét ciklus mellett (a sugárzás mértéke 80 µmol m⁻² s⁻¹,(US-SQS/L spherical microsenzor, WALZ), melyet egy hidegfény fluoreszcens lámpatest biztosított (Tungsram F-33, 40 W). A kései exponenciális növekedési fázis elérése után a sejtek összegyűjtése GF/C szűrőpapíron (Watman) keresztüli centrifugálással történt. A médiummentes alga biomasszát rögtön lefagyasztottuk -20 °C fokon, majd liofilizáltuk. A kivonat készítéséig a szárazanyagot -20 °C-on tároltuk. Az algák feltárását desztillált vízben ultrahangos homogenizátorral (Cole-Palmer 4710 series) végeztük. A balatoni törzsek esetében 3 ciklust (1 ciklus 5 másodpercig tartott, melyet 5 másodperc szünet követett), míg a C. raciborskii AQS törzse estében 2 x 5 ciklust alkalmaztunk. Feltárás közben a mintáinkat jégen tartottuk. A feltárás hatékonyságát mikroszkópban ellenőriztük.

3.4. A cianotoxinokkal és cianobaktérium kivonatokkal történő kezelések

Kísérleteinkhez a tisztított cianotoxinokat Prof. Borbély György kutatócsoportja készítette el és bocsátotta rendelkezésünkre. A cilindrospermopszint (CYN) *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) ILC-164es törzséből, a mikrocisztin-LR-t (MC-LR) *Microcystis aeruginosa* BGSD 243-as törzséből izolálták, majd tisztították. (Kós és mtsai., 1995; Vasas és mtsai., 2002; Vasas és mtsai., 2004).

További kísérleteinkben 5 cianobaktérium törzsből készített kivonatot teszteltünk, melyek a következők voltak: 4 Balatonból izolált törzs: *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumok (ACT 9502, ACT 9503, ACT 9504, ACT 9505) valamint egy bizonyítottan cilindrospermopszint termelő egzotikus törzs: a *Cylindrospermopsis raciborskii* (AQS) törzse (Valério és mtsai., 2005).

A kezelések során a tisztított toxinok és a cianobaktérium kivonatok koncentráció és időfüggő hatásait viszonyítottuk a kontroll sejtekhez. A toxinok és kivonatok szérummentes F-12/Ham médiumban kerültek hígításra a megfelelő végkoncentráció eléréséig, mivel a szérumot tartalmazó médium lecsökkentheti a toxicitást. A kontroll sejteken a kezelések kezdetekor az FBS-t tartalmazó médiumot szintén szérummentesre cseréltük ki.

A vizsgált koncentráció tartomány MC-LR estében 5 μ M - 100 μ M, míg cilindrospermopszin esetében 0,5 μ M - 5 μ M volt. A kivonatok esetében a végkoncentrációk 0,02 - 5 mg/ ml voltak. Kezelési idők: kromatin állomány 24 óra, a citoszkeletális vizsgálatoknál 24 óra;

esetenként 48 és 72 óra, míg az LDH enzimaktivitás vizsgálatoknál 3 és 24 órás expozíciós időt alkalmaztunk.

3.5. Szinkronizált sejtek előállítása és ellenőrzése

A kontroll sejtek kromatin szerkezet vizsgálatához szinkronizált sejtpopulációt állítottunk elő elutriálással. A tenyésztett sejtek szüretelését 600 g centrifugális erővel végeztük 5 percig, majd újra szuszpendáltuk 1%os FBS- tartalmazó médiumban.

Az elutriálás egy olyan centrifuga rotor segítségével történik, melyben a sejtek egy, a centrifugális erővel ellentétes irányú folyadékáramlás hatására méret szerint szeparálódnak, így az azonos sejtciklus fázisba tartozó sejtek külön frakciókba gyűjthetők (6. ábra). A rendszer egy Sanderson elutriáló kamrával (Beckman Instruments) és egy MasterFlex (Cole-Palmer Instruments) perisztaltikus pumpával volt felszerelve. A rendszert használat előtt 70%-os etanollal mostuk át ezzel sterilizáltuk, a hőmérsékletet 20 °C-ra állítottuk be, majd 10⁸ sejtet töltöttünk a JE-5.0 centrifugában lévő elutriáló rotor kamrájába (Beckman Intruments, Palo Alto, CA, USA).

Az elutriálás során állandó centrifugális erő alkalmazása mellett az ellenáram sebességét folyamatosan növeltük: a kezdeti érték 13 ml/perc volt, majd minden soron következő frakciónál mindig 6 ml/perccel növeltük az áramlási sebességet az előző frakcióhoz képest. Egy-egy frakcióba 100-100 ml-t gyűjtöttünk. Az elutriálás során 8 sejtfrakciót nyertünk, mely frakciók sejtjeinek azonos sejtciklusba tartozását, áramlási citométerrel (Beckton Dickinson) ellenőriztünk.



6. ábra Az elutriálás módjának sematikus ábrázolása (Bánfalvi, 2008)

A sejtek sejtciklusbeli állapotát, annak jellemzőit propidium jodidos (PI) festéssel határoztuk meg (Gácsi és mtsai., 2005). Az így jelölt sejtmagok DNS tartalma arányos annak fluoreszcenciájával. A G0 és G1 fázisokban lévő magok DNS tartalma (2C) pontosan fele a G2 és M fázisban lévő magokénak (4C). Az 1C érték a haploid genom DNS tartalmának felel meg. Az S fázisban lévő magok DNS tartalma 2C és 4C érték közé esik. A szinkronizált sejteket szobahőmérsékleten fixáltuk 70%os metanollal, majd 50µg/ml koncentrációjú propidium-jodid oldattal festettük. A festett sejtek tulajdonságait (sejttérfogat, sejtmag térfogat, sejtmagátmérő, DNS tartalom - C értékben kifejezve) FACS scan flow citométerrel határoztuk meg. A mérésekhez a Cell Quest szoftvert (Beckton Dickinson) alkalmaztuk.



3.6. A sejtmag preparátumok izolálása és a kromatin állomány fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata

A kontroll és kezelt sejteket reverzibilis permeabilizációnak vetettük alá (Bánfalvi és mtsai., 1984), majd úgynevezett magnövelő pufferben (50 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 3 mM ditiotreitol, 5 mM NaPO₄ puffer, pH 8.0) tartottuk 10 percig 37 °C-on. Ezt követően a sejteket fixáló elegyben (metanol:jégecet, 3:1) vettük fel. Többszöri fixáló elegyben történő mosás és centrifugálás (600g, 5 perc) után a fixált sejtmagokat kb. 30 cm-es magasságból cseppentettük a tárgylemezre, a sejtmaghártya felszakadásának érdekében. Egy éjszakán keresztül száradni hagytuk szobahőmérsékleten, majd másnap 1x mostuk foszfát puffer oldattal (PBS), majd hagyományos módon felszálló alkohol sorban (70%, 90%, 95% és 100%) dehidratáltuk. Ezután 25 ng/ml DAPI-t tartalmazó ANTIFADE-médiummal (90% glicerol, 2% DABCO, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,02% nátrium-azid) fedtük. Mintáinkat Nikon Optiphot II. epifluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk, Spot software-rel digitalizáltuk.

3.7. A sejtváz szerkezetben bekövetkezett változások detektálása immuncitokémiai módszerrel

A festéseket a gyártó által megadott módszerek alapján végeztük el mindkét esetben (Sigma).

A mikrofilamentumok láthatóvá tételéhez a sejteket a kezelési idő lejártakor egyszer mostuk PBS-sel, majd rögzítő folyadékra (4% paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS-re) cseréltük és szobahőmérsékleten fixáltuk 5 percen keresztül. Ezután kétszer mostuk

PBS-sel, majd 1:5000-szeresre hígított falloidinhez konjugált fluoreszceinizotiocianáttal (FITC) festettük az aktin filamentumokat 3 órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után kétszer 5 percig öblítettük PBS-sel, majd egyszer desztillált vízzel. A sejtmagok láthatóvá tételéhez itt is DAPI-ANTIFADE oldatot alkalmaztunk.

A tubulin filamentumokat Cy3-mal konjugált monoklonális anti-βtubulin antitesttel tettük láthatóvá. Ehhez a sejteket a kezelési idő lejárta után egyszer mostuk PBS-sel, majd -20 °C-os metanollal 10 percig és azt követően 10 másodperig -20 °C-os acetonnal fixáltuk. Ezután a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd PBS-ben hagytuk 30 percig rehidratálódni. Az anti-β-tubulint 1:200 hígításban alkalmazva festettük a sejteket 3 órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után kétszer 5 percig öblítettük PBS-sel, majd egyszer desztillált vízzel. Tárgylemezre DAPI-ANTIFADE oldatot pipettáztunk, - mely a sejtek DNSéhez kötődik -, majd a cseppekre tettük rá a kerek fedőlemezkéket, sejtekkel lefelé.

Mintáinkat Nikon Optiphot II. epifluoreszcens mikroszkóp segítségével elemeztük, Spot software-rel digitalizáltuk. A tipikus sejtszerkezetekről minden minta esetén 30-30 fotót készítettünk, mind a DAPI-val, mind a falloidin-FITC-el illetve a Cy3-mal konjugált anti-β-tubulinnal történő festés esetében. Az így kapott képeket Adobe Photoshop szofter segítségével egymásra helyeztük, hogy ugyanazon sejtek esetén egy képen legyenek láthatóak az aktinváz (zöld) és a sejtmag (kék), valamint a tubulin filamentek (vörös) és a sejtmag (kék).

3.8. LDH enzimaktivitás vizsgálatok

A tejsav-dehidrogenáz enzimaktivitás meghatározása a klinikai orvos diagnosztikában is jól bevált módszer, és széles körben használják a membrán permeabilitás változással együttjáró betegségek jellemzésére, ugyanúgy ahogyan toxikológiai vizsgálatokban a sejt életképesség meghatározására. Bármilyen sejtsérüléssel járó folyamat az LDH enzim aktivitásának növekedését fogja kiváltani. Az aktivitás meghatározásának alapja, hogy az enzim a piruvátot NADH jelenlétében laktáttá alakítja (7. ábra). A reakció a NADH fogyásával követhető nyomon, a plate-olvasón mért abszorbancia-változás alapján.



7. ábra Az LDH katalizálta reakció. A laktát dehidrogenáz a piroszőlősavat tejsavvá alakítja

A kezelések után a sejtek membrán permeabilitásának változását LDH aktivitásméréssel vizsgáltuk. Annak érdekében, hogy a feltárt cianobaktérium-szuszpenzióból minél kevesebb sejttörmelék kerüljön a sejtekre, a hígítást megelőzően az algamintákat sterilszűrőn átszűrtük. A tisztított toxinokat és a cianobaktérium-kivonatokat FBS nélküli F-12/Ham médiumban hígítottuk ki adott koncentrációra 250 µl-es végtérfogatra (8. ábra). Minden vizsgált koncentráció és időpont esetén három párhuzamban



történtek a mérések. A kontroll sejtek egy része pozitív kontrollként szolgált: ezekre mérés előtt egy órával 5 µl TritonX-100-at (TrX-100) pipettáztunk. A TrX-100, mint erős detergens szétroncsolja a sejteket, az összes LDH-t felszabadítja. Így megkapjuk azt a maximális LDH koncentrációt, amit a sejtek tartalmaztak.



8. ábra LDH (laktát dehidrogenáz) méréshez előkészített mikrotiter lemez ACT 9502, ACT 9503, ACT 9504 és ACT 9505 kódú Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* cianobaktérium törzsekkel

A méréshez, a mikrotiterlemezbe a kezelési idő lejárta után mindegyik mintából 40 µl felülúszót, 250 µl NADH oldatot (0,2 mM NADH 0,1 M Tris- NaCl- pufferben pH 7,2 oldva) és 40 µl piruvátot (10 mM piruvát 0,1 M Tris-NaCl-ban pH, 7,2 oldva) pipettáztunk (Menezes és mtsai., 2006), majd Viktor³ plate olvasó készülékkel (Perkin-Elmer) mértük az abszorbanciaváltozást. A spektrofotometriás mérés alapja, hogy a NADH molekula abszorpciós spektrumának maximuma 340 nm-en található. Ezen a hullámhosszon mérjük az abszorbancia változást az inkubációs idő függvényében, mely az enzimaktivitással arányos. A készülék minden minta esetén megmérte az abszorbanciát és ezt azonos időközönként, 15-ször megismételte. Két mérés között, amíg a mérőfej újra ugyanahhoz a lyukhoz ért, 44,25 s telt el. Az extinkció - reakcióidő görbe lineáris szakaszának meredekségéből számoltuk az enzimaktivitást. A kapott eredményekből minden egyes lyukra LDH aktivitást számoltunk a következő képlettel:

$$LDH = (\Delta A / \min \times 10^6 \times TV) / (6.3 \times 10^3 \times L \times V),$$

ahol:

 $\Delta A/min - abszorbanciváltozás egy perc alatt;$ TV- a teljes reakcióelegy térfogata ml-ben; $<math>6.3 \times 10^3 - a$ NADH moláris abszorpciója 340 nm-en; L- a fény útja mm-ben (ez a mi esetünkben 0,7) ; V- a minta térfogata ml-ben.

Mivel a módszer fotometriai mérésen alapul és a mintáknak is van egy háttér abszorbanciája, ezért minden hígításnál a neki megfelelő háttér abszorbanciát is lemértük és az erre kapott LDH aktivitási értékeket kivontuk a kezelt sejtek esetén kapott LDH aktivitási értékekből (vak minták). Az így kapott eredményeket, hogy pontosan tudjunk vonatkoztatni a sejtszámra, a mintákban jelen levő fehérje mennyiségre korrigáltuk.

A minták fehérje mennyiségét a M. Bradford által kidolgozott módszer segítségével fotometriásan határoztuk meg (Bradford, 1976). A kezelési idő leteltével a felülúszó eltávolítása után a sejteket egyszer öblítettük Tris-NaCl pufferrel (pH 7,2), majd 200 μl feltárópufferben (Tris-NaCl 1% Triton X-100, pH: 7,2) egy éjszakán át -20 °C-on tároltuk. Másnap a minták felengedése után azokat 10000 rpm fordulaton, 4 °C-on 8 percig centrifugáltuk (Biofuge *fresco*, Heraeus). A fehérjetartalom 39 megállapításához, 10 µl felülúszót, 70 µl Tris-NaCl puffert és 60 µl Bradford reagenst használtunk fel. A Bradford reagens hozzáadása után a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd mértük a minták abszorbanciáját 595 nm-es hullámhosszon Victor³ mikrotiter lemez-olvasó készülékkel.

3.9. Statisztika

Eredményeinket Origin7-es programban ábrázoltuk. Azt, hogy az LDH aktivitás a koncentráció függvényében a kontrollhoz képest szignifikánsan változott-e vagy sem, lineáris regresszióval vizsgáltuk. A cianobaktériumok toxicitását a J.J. Hubert-féle probitszám analízissal hasonlítottuk össze (Hubert, 1980). Mindegyik esetben kiszámoltuk, hogy a kapott LDH értékek hány százalékát jelentik a pozitív kontrollnak, majd ezt a megadott táblázat alapján probitanalízissel kiszámoltuk azt az értéket, amely esetén az anyag az általa maximálisan kifejthető hatás 50%-át kiváltja (EC₅₀). Ez alapján össze tudtuk hasonlítani a toxinok és a cianobaktériumkivonatok toxicitását. A kísérletek mindegyikét legalább háromszor megismételtük.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

4.1. A CHO-K1 sejtek kromatinállományának szerkezetbeli változásai

A cianotoxinok és cianobaktérium kivonatok által kiváltott sejtszintű hatások megbízható leírásához szükségesnek tartottuk a kontroll körülmények között tartott sejtpopulációk jellemzését is.

4.1.1. A szinkronizált CHO-K1 sejtek áramlási citometriás jellemzése

A sejtek szinkronizálása a sejtek mérete és DNS tartalma közötti összefüggésen alapul. A DNS tartalmat, a sejtek örökítő anyagához, a DNShez kötődött propidium jodid (PI) által kibocsájtott fluoreszcencia alapján határoztunk meg. A szinkronizálást centrifugálásos elutriálással végeztük (Bánfalvi, 2008). Az elutriálás során 8 frakciót gyűjtöttünk, ebből az első nem került felhasználásra, mert ebben a frakcióban van jelen a sejttörmelék és az elpusztult sejtek. A további frakciókban meghatároztuk a sejttérfogatot, a sejtmagtérfogatot, a sejtmagok átmérőjét és a DNS tartalmat. Eredményeinket a 9. ábra és 1. táblázat összegzi.

A sejtmagokat PI-dal festettük, ennek fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg. A 9.A ábra mutatja az egyes frakciókhoz (E1-E8), illetve a kontroll populációkhoz tartozó sejtmagok C érték eloszlását. (Az 1C-érték egy sejt haploid genom tartalmának felel meg.) A 9.B ábra a sejtmagátmérő eloszlását szemlélteti a szinkronizálatlan kontroll és a frakcionált mintákban.



9. ábra Centrifugálásos elutriálással szinkronizált sejtek áramlási citometriás analízise. A) Elutriált sejtfrakciók áramlási citometriás profilja, B) Elutriált sejtek sejtmagátmérője

Jól látható, hogy mind a sejt, mind a sejtmag méretének növekedése alapján hatékonynak bizonyult a sejtek frakcionálása, az egyes frakciókba a sejtciklus azonos alfázisába tartozó sejtek kerültek. A haranggörbe csúcsa a frakciószám növelésével egyre jobban eltolódik a 2C értéktől a 4C érték felé.

42

-	Frakció	Ellenáramlás	Átlagos sejt	Átlagos	Átlagos	Átlagos
	szám	mértéke	térfogat	sejtmag	sejtmag	C- érték
		(ml/perc)	(fl)	térfogat (fl)	átmérő	
					(µm)	
	1	13	770	Nem volt mérhető	Nem volt mérhető	2,02
	2	19	836	190	Nem volt mérhető	2,20
	3	24	988	230	7,2	2,55
	4	30	1119	250	7,6	2,76
	5	36	1268	280	8,0	2,98
	6	41	1498	335	8,5	3,28
	7	47	2004	470	9,9	3,72
	8	52	2618	530	10,3	3,99

1. Táblázat Az elutriált frakciókban lévő sejtek paraméterei (Az adatok 3 méréssorozat átlagát mutatják) fl= femtoliter (10⁻¹⁵ liter)

A 2. frakcióban a normál G1 állapotú diploid sejtekre jellemző 2C értéket kaptuk $2.02 \pm 0,05$. A frakció szám növekedésével megfigyelhető a C-érték növekedése illetve a többi sejtparaméter értékének a növekedése is. A 3. frakcióban a korai S fázisú sejtek domináltak 2,55-ös C értékkel, míg a 4-5. frakcióban a korai és középső S fázisú sejteket találjuk, melyekben már 2,76-2,98 az átlagos C–érték. A 6-7. frakció a késő S fázisú sejteket tartalmazza. Itt már 3,28-3,72-es C-érték átlagokat mértünk. Végezetül a 8. frakcióban a késői S, G2, M fázisú sejteket figyelhettük meg 4C közeli értékekkel. A sejtek sejtciklusbeli állapota a sejtmagátmérő mértékének változásával is jól nyomon követhető volt.

4.1.2. A frakcionált sejtek kromatinállományának morfológiai változásai

A 2. frakcióban a korai S fázisú sejteket figyelhetjük meg. A sejtek kromatinállományára jellemző, hogy erősen dekondenzált állapotban van. Kromatin szerkezetükre elsősorban a fátyol-, felhőszerű, bolyhos képletek a jellemzőek (10. ábra, 2. frakció). A következő frakcióban, mely a 2.55 C értékkel rendelkező sejteket tartalmazta, már megfigyelhető a magállomány polarizációja: a kromatinállomány perifériás részén kompaktabb foltok jelennek meg, melyek a később kialakuló kromoszómák előtelepei. A felhő-, fátyolszerű struktúrák jelenléte mellett már megfigyelhetjük a szupertekercselődésre utaló figurák megjelenését is (10. ábra, 3. frakció).

A 4. frakció a korai-középső S fázisú sejteket tartalmazza. A frakcióban további kondenzálódás figyelhető meg; a kromatin átmenet fátyol formából további szupertekercselődéssel szalag alakba. A tekercselődés tovább folytatódik, a fátyolszerű kromatin vastagabb szupertekercselt hurkokat alkot, szalagszerű képleteket hoz létre. Néha vékonyabb szálakat is tartalmaz, melyek körülbelül a 300 nm vastag átmérőjűk eukromatin fibrillumokhoz hasonlítanak (10. ábra, 4. frakció). Az 5. frakcióban a fibrilláris struktúrák további kondenzációja figyelhető meg (10. ábra, 5. frakció).

A 6. frakcióban elősorban lineáris elrendeződésű kromatinstruktúrákat találtunk. Vastagabb és vékonyabb kromatin sturuktúrákat egyaránt megfigyeltünk kondenzálódott kromatin képletek jelentek meg (10. ábra, 6. frakció). A kromatin struktúrák végei még szupertekercselődést mutatnak, ez is jelzi a vékonyabb 300 nm átmérőjú fonalak vastagabb, 700 nm vastagságú fonalakká történő kondenzálódását.

A 10. ábra 6. frakció B ábráján lévő kromatinstruktúra gerincét a C ábrán fekete vonallal, míg végeit körrel jelöltük. A kromatinszál folytonossága az elongált prekromoszómális stádiumig fent maradt.



10. ábra Az egyes frakciókra jellemző tipikus kromatinalakzatok. Lépték5μm

A késői S fázisban (10. ábra, 7. frakció) megfigyelhetőek az ívesen, félkörívben elhelyezkedő prekromoszómák. Néhány esetben az egyes kromoszómák már tisztán kivehetőek (10. ábra, 7. frakció E-H). Az utolsó frakcióban már a kompakt kromoszómák jelennek meg, de a kondenzáció

csak a metafázisban éri el a kondenzáltság legmagasabb fokát. A lineáris elrendeződés még itt is megfigyelhető (10. ábra, 8. frakció, E kép).

A kromatin kondenzálódás fluoreszcens mikroszkóppal történő vizsgálatát más sejtvonalakon: K-562-humán leukocita, IM indian muntjac fibroblaszt sejteken is elvégeztük, ahol hasonló struktúrákat figyeltünk meg az egyazon sejtciklusú populációba tartozó sejteknél (Bánfalvi és mtsai., 2006). Elmondhatjuk, hogy a kromatin állomány kromoszómákká történő kondenzálódása a magasabb különböző eukarióta sejtekben azonos mechanizmus szerint történik. A G1 és a korai S fázisú sejtek 2-2,5 C értéket mutató populációjának kromatinállományára a elsősorban a felhő-, fátyolszerű képletek a jellemzőek. Az egyre növekvő frakció számhoz egyre szupertekercseltebb kromatinszerkezetek tartoznak, vagyis az utolsó, 8. frakcióban már a legtömörebb, metafázisos kromoszóma sturuktúrákat kaptuk. Mivel a DNS kromatin szerkezete és a nukleoszómális csomagolás közeli kapcsolatban vannak a génszabályozással, ezért napjainkban a kromatin struktúrák szerkezete, energetikája és dinamikája intenzíven kutatott terület (Grigoryev és mtsai., 2009).

4.1.3. A tisztított cianotoxinok hatása a CHO-K1 sejtek kromatin állományának kondenzálódására

A cilindrospermopszin kromatinállomány kondenzálódást befolyásoló hatását 24 órás expozíciós idő mellett 0,5 és 5 µM közötti koncentráció tartományban vizsgáltuk, mig mikrocisztin-LR esetében a vizsgált koncentráció tartomány 2-50 µM volt. A kromatin preparátumokat az anyag és módszer fejezetben ismertetett módon készítettük el.

Cilindrospermopszin jelenlétében a legkisebb alkalmazott koncentráció esetében a normál folyamatra jellemző figurákat figyelhettük meg, azonban már 1 µM-os toxin koncentráció esetén a kromatin kondenzálódás folyamata zavart szenvedett. Az S fázisú állapotban lévő sejteknél "lyukakat" figyelhettünk meg a kromatinállományban (11. ábra). Hasonló jelenséget tapasztaltunk korábbi kísérleteinkben is, ahol kadmiummal kezeltünk CHO-K1 sejteket (Bánfalvi és mtsai., 2005). Metafázisos kromoszómákat nem tudtunk megfigyelni, ami arra enged utalni, hogy a sejtciklus második ellenőrző pontja valószinűleg hibát talált a DNS megkettőződésében és nem hagyta a sejteket a mitózis fázisába átlépni (11.B-C Fibrózus, fragmentálódott kondenzált ábra). torz, prekromoszómákat figyelhetünk meg. 2 µM-os koncentrációnál még kifejezettebb ez a hatás (11.D-F ábra). A kromatin állomány kromatin rögökké összecsomósodott formában jelent meg.



11. ábra Cilindrospermopszin hatása a CHO-K1 sejtek kromatin állományára. A-C: 1 μ M, D-F: 2 μ M Lépték: 2 μ m



12. ábra A-C: 20 μM-os, D-F: 50μM MC-LR kezelés hatása a CHO-K1 sejtek kromatin kondenzációjára. Lépték: 2μm

Amennyiben a sejteket alacsonyabb koncentrációjú MC-LR-rel kezeltük (2-10 μ M), az nem indukált szignifikáns változást a maganyag kondenzálódásában, a tipikus alakzatok, mint a fátyol, a fonal, a

48

szupertekercselt kromatin, a prekromoszómák és a kromoszómák, mind megfigyelhetőek voltak. A 20 μ M-os koncentrációnál azonban már változásokat detektálhattunk (12.A-C ábra). A MC-LR kezelés koncentráció és idő függő módon befolyásolta a kromatinállomány kondenzálódásának normál folyamatát, a sejtek a késői S-fázis és a mitózis korai stádiumában megálltak, mely gyakran nyilvánult meg abnormálisan hiperkondenzálódott, törött elongálódott prekromoszómák, illetve apoptotikus testek formájában (Gácsi és mtsai., 2009). 50 μ M-os kezelésnél már csak apoptotikus rögöket tudtunk megfigyelni (12.D-F ábra).

Humpage és mtsai. (2000) szintén kimutatták a CYN genotoxikus hatását egy humán limfoid sejtvonalon (WIL2-NS). Ebben a rendszerben egész kromoszómavesztéseket figyeltek meg már 1 μ g ml⁻¹ (2,41 μ M) koncentrációtól, míg száltöréseket 6 μ g ml⁻¹ (14,46 μ M)-tól. Az általunk alkalmazott CYN koncentráció ezen értékeknél alacsonyabb volt, tehát feltételezhetjük, hogy a sejtvonalunk érzékenyebb, mint a limfoid sejtvonal. Feltételezések szerint az egész kromoszómavesztések a kinetokor fehérjék lebomlásának a következményei, míg a száltörések a toxin metabolikus aktiválódásának közvetlen következményei (Terao és mtsai, 1994).

A cilindrospermopszin uracil komponense mellett tartalmaz egy reaktív guanidin és egy szulfát csoportot melyeken keresztül szintén toxikus hatást fejthet ki a DNS-re és az RNS-re. Shaw és munkatársai (2000) egereken mutatták ki a cilindrospermposzinnak illetve metabolitjainak kovalens kötődését a DNS-hez.

Shen és mtsai., (2002) DNS fragmentálódást mutattak ki azon állatok májsejtjeinél, ahol az egyedeket LC₅₀ mennyiségű cilindrospermopszinnal

kezelték, habár ilyen mértékű kezelés mellett a DNS integritására kifejtett hatás a toxin direkt hatásának következménye is lehet.

Ezzel ellentétben COMET assay-jel (egy sejtes gélelektroforézis) nem mutattak ki genotoxikus hatást CYN–nel kezelt anyagcsere deficiens CHO-K1 sejteknél (Fessard és Bernard, 2003). A cilindrospermopszin alacsony koncentrációban elsődlegesen a fehérjeszintézisre hat, míg magasabb koncentrációban egy gyorsabb toxikus hatás dominál, ami a toxin metabolizációja során keletkezett termékeknek tudható be (Froscio és mtsai., 2003).

Lankoff és munkatársai (2007) szintén arról számoltak be, hogy rövidebb idejű cilindrospermopszin expozíció (≤ 21 óra) a mitotikus index értékét szignifikánsan csökkenti koncentráció és időfüggő módon, annak ellenére, hogy esetükben a cianotoxin még 2 µg·ml⁻¹-es koncentráció jelenlétében sem indukál szignifikáns kromoszóma abberációt a kontroll csoporthoz képest. Beyer és munkatársai (2009) kimutatták nád szövettenyészetben, hogy a 0.5–5 µg·ml⁻¹ CYN hatására a korai mitózis szakaszában lévő sejtek aránya megnőtt, míg a metafáziban lévő sejtek aránya csökkent. A legmagasabb korai mitózis szakaszban lévő sejt arányt és a legkisebb metafázisban lévő sejtarányt 2,5 µg·ml⁻¹ CYN koncentrációnál mutatták ki.

A genotoxikus hatás talán annak megnyilvánulása, hogy a köztudottan protein szintézis inhibitor cilindrospermopszin gátolhatja azon fehérjék képződését is, melyek a sejteknek a mitózisba való belépéséhez szükségesek, illetve a mitózisba belépve az egyes alszakaszokba való átlépést szabályozzák. A cilindrospermopszin genotoxikus hatása nagy valószínűség szerint a citokróm-P450 által átalakított metabolitoknak is

köszönhető. A cilindrospermopszin gátolja a glutation szintézist is, stimulálja a reaktiv oxigéngyökök keletkezését, ami szintén citotoxikus hatást vált ki (Runnegar és mtsai., 1994). Korábban már különböző *in vitro* modelleken leírták a toxin sejtkárosító hatását, mint a protein szintézis gátlás, a citokróm-p-450 metabolizmus függő citotoxicitás, és a genotoxicitás (Froscio és mtsai., 2001; 2003; Humpage és mtsai., 2000; Runnegar és mtsai., 1994). A fehérjeszintézist az elongációs fázisban gátolja (Froscio és mtsai., 2001; 2003; Terao és mtsai., 1994). Primer hepatocita tenyészeteken azt is megfigyelték, hogy a fehérjeszintézis gátlás irreverzibilis és független bizonyos citokróm-P450 gátlók jelenlétében (Froscio és mtsai., 2003). Egereken végzett kísérletek szintén arra engednek következtetni, hogy a cilindrospermopszin karcinogén hatással is bír (Falconer és Humpage, 2001).

Batista és mtsai. (2003) primer humán hepatocitákon a kromatin kondenzálódás során abnormális anafázisú szabálytalan kromoszómákat figyeltek meg mikrocisztin hatására. Lakshmana Rao és mtsai. (1998) BHK-21 és MEF sejteket kezeltek mikrocisztin tartalmú cianobaktérium kivonattal és tisztított mikrocisztinnel, mely szintén DNS fragmentálódást váltott ki: kivonat esetében viszonylag nagy koncentráció alkalmazásakor (100 μ g·ml⁻¹), míg mikrocisztin esetében 1-2 μ g·ml⁻¹ koncentráció mellett. McDermott és munkatársai (1998) különböző sejtvonalakon (hepatocitán, endothelialis sejteken, promielocitakon és epitheliális sejteken) szintén kimutatták a MC-LR kromatin kondenzációt befolyásoló hatását. Limfocitákon nem tudtak kimutatni szignifikáns változást kromoszóma abberációk tekintetében, viszont a mitotikus indexben már 18 órás expozíciós idejű 1 μ g·ml⁻¹ koncentrációjú MC-LR kezelés szignifikáns változást okozott (Zegura és mtsai., 2008). Comet assay-vel vizsgálva is

kimutatták a mikrocisztin DNS-t károsító hatását, mely 18 órás inkubációs idő után elérte a maximum értéket (Lankoff és mtsai., 2004).

Ding és munkatársai (1999) Ames teszt-tel illetve Comet assay eljárással kimutatták, hogy a mikrocisztin tartalmú cianobaktérium kivonat DNS károsodást, és erős mutagén hatást vált ki, míg Zegura és munkatársai (2003) ugyanezt tapasztalták idő és koncentráció függő módon humán hepatoma sejtvonal esetében.

In vivo, egereken is kimutatták a mikrocisztin DNS fragmentáló hatását, mely korrelál a kapott LDH aktivitási, alkalikus foszfatáz és γ-glutamil transzferáz mérésekkel (Rao és Bhattacharya, 1996).

Máthé és mtsai. (2009) szerint a MC-LR nem állítja meg a sejteket a telofázis illetve a citokinézis során, hanem csak ezen mitótikus szakaszok időtartamát nyújtja meg.

A mikrocisztin-LR sejtosztódásra kifejtett hatása a protein foszfatázoknak (PP1 és PP2A) a sejtciklus során játszott kulcsszerepével magyarázható (Ayaydin és mtsai., 2000; Brautigan, 1994; Smith és Walker, 1996). A PP2A-nak reguláló funkciója van a testvér kromoszómák kialakításában, valamint a mitózisból való kilépés folyamatában (Trinkle-Mulcahy és Lamond, 2006), és mitogén aktiváló protein kinázokat (MAPK) szabályozó képességgel is rendelkezik (Tamura és mtsai., 2002). Ezek a MAPK többek közt a sejt proliferációjához szükséges gének átírását szabályozzák (Toivola és Eriksson, 1999). MC-LR hatására a sejtek foszforilációs rendszerének egyensúlya felbomlik és ez sejtciklusbeli zavarokat vált ki.

Más kísérleteinkben immuncitokémiai módszerrel igazoltuk, hogy a mikrocisztin-LR a CHO-K1 sejteken apoptózist indukál koncentráció és időfüggő módon (Gácsi és mtsai., 2009). A mikrocisztin már 1 μM 52 koncentráció esetén apoptózist indukált patkány és lazac hepatocitákban is (Fladmark és mtsai., 1998).

Az apoptózis korai stádiumában a magi partikulumok szemtől szembe csomagolódnak a 11 nm-es szálakban, majd fokozatosan csavarodva egy szorosan szőtt hálózatot hoznak létre. Ez a hálózat végül összeesik és denz apoptotikus testeket képez. A nukleoszómák szoros szemtől szembeni csomagolása az egyik sajátsága az apoptotikus kromatinnak, mely összefügg az acetilálatlan H3 és H4 hisztonok mennyiségének növekedésével (Allera és mtsai., 1997).

A mikrocisztin-LR a p53-as fehérje fokozott foszforilációját okozza (Guzman és mtsai., 2003), mely fokozza a p21es fehérje génjének átírását, majd maga a p21-es fehérje kötődik a ciklin - ciklin-dependens- kináz komplexhez, annak gátlását fogja kiváltani és ez a sejtciklus G1/ S átmenetnél történő leállásához vezet.

Eredményeink igazolják azon feltételezést, miszerint mind a cilindrospermopszin, mind a mikrocisztin-LR hatással van az élő sejtek örökítőanyagának, a DNS-nek a kondenzálódására.

4.1.4. A *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek kivonatainak hatása a kromatin kondenzálás folyamatára

Laboratóriumi körülmények között jól nevelhető bizonyítottan cilindrospermopszint termelő AQS törzzsel és a Balatonból izolált *C. raciborskii* törzsekkel végeztünk kromatin vizsgálatokat. Előzetes tájékozódó jellegű kísérleteink eredményei alapján mindegyik izolátum felhasználásával olyan tenyészmédiumokat készítettünk, melyben a

cianobaktérium kivonatok koncentrációja 2 mg⁻ml⁻¹ volt. A sejteket 24 órán át inkubáltuk. Eredményeinket az alábbiakban ismertetem.

Az AQS törzsjelű *Cylindrospermopsis raciborskii* tenyészetekből készült kivonatok erőteljes apoptotikus hatást mutattak a DAPI-val történő DNS festés után. A sejtmag több kisebb partikulumra való szétesését észleltük. A sejtciklus kezdeti fázisára jellemző felhőszerű képletek is csak nagyon kis számban fordultak elő. A legtöbb sejt az S és G2 fázisban volt a kromatinállomány kompaktságát tekintve. Szupertekercselt kromatinfibrillumok és apoptotikus rögök voltak a domináns struktúrák. Kromoszómákat egyetlenegy preparátumban sem detektáltunk. Mindez megerősíti a cilindrospermopszin jelenlétét a kivonatunkban.

ACT 9502-as törzsszámú balatoni C. raciborskii izolátum a korai S sejtciklus állapotoknál nem okozott változást, megfigyelhettük a kezdeti felhő jellegű szerkezeteket, illetve a korai S fázisra jellemző szupertekercselődést (14.A ábra). A késői S fázisban eltérést tapasztaltunk, erőteljesebb széli kondenzálódás volt megfigyelhető (14.C-D ábra). A kontroll populációhoz képest nagyobb arányban fordultak elő prekromoszómák, azonban metafázisos kromoszómák kisebb a gyakorisággal voltak jelen.



13. ábra Az AQS törzs kivonatának hatása a CHO-K1 sejtek kromatin állományára 24 órás 2 mg·ml⁻¹-es koncentrációjú kezelés esetén, A) korai S fázis B-D) késői S és G2 fázis, Lépték: 2 μm



14. ábra ACT 9502-es törzs kivonatának hatása a CHO-K1 sejtek kromatin állományára 24 órás 2 mg·ml⁻¹-es koncentrációjú kezelés után A-B) korai S fázis C-D) középső-kései S fázis E) G2 fázis Lépték:5 μm

A vizsgált koncentrációnál az ACT 9503-as törzs kivonata nem befolyásolta a CHO-K1 sejtek kromatinállományának kondenzálódási folyamatát. Minden egyes sejtciklusbeli állapotnak megfelelő struktúrát tudtunk azonosítani. Megfigyelhettük a dekondenzált kromatinállományt, majd a széli területeken elkezdődő fokozottabb kondenzációt, a fátyol, szalagszerű kromatinrostokat (15.C ábra), míg végül a prekromoszómákat és a kromoszómákat (15.A-E ábra).

A négy Balatonból izolált *C. raciborsii* izolátum közül az ACT 9504 törzs kivonata esetében tapasztaltuk a legnagyobb toxikus hatást. Már a sejtciklus korai stádiumaiban: G1, korai S fázisban is megfigyelhettünk eltérést a kontroll populációtól. G1 és korai S állapotú kromatinállomány mintegy hólyagszerű lefűződésének kezdeményeit láthatjuk (16.A ábra). A középső S fázisban már teljesen szétszakadt kromatinállományt észleltünk, megszűnt a kromatinállomány folytonossága (16.B ábra). A késői S fázisú sejteknél nem tapasztaltuk azt a szupertekercselődést, tömörödést, amit a kontroll sejtek kromatinállományánál (16.C ábra). Kromoszómákat csak elvétve figyeltünk meg, nagyon alacsony volt az előfordulási rátájuk.

Az ACT 9505-ös törzsből készült kivonat szintén nem váltott ki számottevő hatást a kromatin szerkezetben a sejtciklus korai fázisában, hasonlóan az ACT 9503-törzsből készülthöz. A fátyolszerű, fonalas képleteket itt is megfigyelhettük, egyetemben a kezdetleges szupertekercselődést mutató alakzatokkal (17.A-B ábra). A középső S fázisban valamivel erősebb széli kondenzálódást tapasztaltunk (17.C-D ábra).

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a kromatin kondenzációra gyakorolt hatás tekintetében a Balatonból illetve a Kis-Balatonból izolált törzsek közül az ACT 9502 és az ACT 9504 mutatott 56 pozitivitást. A másik két *C. raciborskii* izolátumból készült kivonat (ACT 9503, ACT 9505) lényegében nem befolyásolta a DNS állomány kompaktálódásának folyamatát. A pozitív kontrollként használt AQS törzs, cilindrospermopszin tartalmánál fogva hasonló, sőt, toxikusabb eredményt mutatott, mint a CYN-nal kezelt sejtek. A hazai *C. raciborskii* kivonatokkal végzett kísérletek jelentős eltérést mutattak a bizonyítottan CYN tartalmú kivonat hatásaihoz képest. Mai napig kisérletek folynak mind *in vivo* és *in vitro* területen ezen törzsek toxikus hatásáért felelős anyag(ok) azonosításáért.



15. ábra ACT 9503 törzs hatása a CHO-K1 sejtek kromatin állományára 24 órás 2 mg·ml⁻¹-es koncentrációjú kezelés esetén, A) G1 fázis B) korai S fázis C) középső-késő S fázis D) G2 fázis E) M fázis Lépték: 5 μ m

57



16. ábra ACT 9504-es törzs hatása a CHO-K1 sejtek kromatin állományára 24 órás 2 mg·ml⁻¹-es koncentrációjú kezelés esetén, A) G1-korai S fázis B) középső S fázis C) késői S fázis D) G2-M fázis Lépték: 5 μm



17. ábra ACT 9505 törzs hatása a CHO-K1 sejtek kromatin állományára 24 órás 2 mg·ml⁻¹-es koncentrációjú kezelés esetén, A) G1 fázis B) korai S fázis C-D) közéső S fázis E-F) késői S, G2 fázis Lépték: 5 μ m

4.2. A CHO-K1 sejtek mikrofilamentáris rendszerének változásai

A cianobaktériumok toxicitásának monitorozására gyakran használják a citoszkeletális rendszert is (Herfindal és mtsai., 2005). Ebben az alfejezetben a tisztított toxinok és a nyers cianobaktérium kivonatok emlős sejtek mikrofilamentáris elemeire kifejtett hatásait mutatjuk be. 4.2.1. A tisztított cianotoxinok hatása az CHO-K1 sejtek aktin szerkezetére

A mintákat az előzetes kezelések után az Anyag és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően készítettük el. A 18.A ábrán látható a kontroll sejtek aktin szerkezete. Itt a normál, ép sejtre jellemző aktin szerkezetet figyelhetjük meg a kérgi aktinnal és a stresszrostokkal, 24 órás expozíciós idő után. Amennyiben alacsonyabb cilindrospermopszin koncentrációval (0,5 µM és 1µM) kezeltük a sejteket, a stresszrostok eltűnését figyelhettük meg (18.B ábra), helyettük szivacsos szerkezetet láthattunk. További CYN koncentráció emeléskor (2 µM és 5 µM) az aktin filamentumok teljes depolimerizációja következett be (18.C és D ábra). Néhány helyen még foltokban felfedezhetők a depolimerizálódott mikrofilamentumok nyomai. CYN jelenlétében a sejtek zsugorodása apoptotikus elváltozásokra utal.

Hosszabb expozíciós időt vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a cilindrospermopszin toxicitása adott koncentráció esetében (1 μ M) időfüggést mutat. 48 órás 1 μ M CYN-nel történő kezelés után a sejtek lekerekedtek, az aktin filamentumok erőteljesen depolimerizálódtak, a sejtmag köré koncentrálódtak (19.B ábra). 72 órás expozíció esetén az aktin filamentumok teljes lebomlását tapasztaltuk (19.C ábra). Figyelmet érdemel a sejtek méretének csökkenése is, mely tipikus apoptotikus jelenség.



18. ábra A CHO-K1 sejtek aktin szerkezetében bekövetkezett változások különböző koncentrációjú cilindrospermopszinnal történő 24 órás expozíció után A) kontrol B) 1μM C) 2 μM D) 5 μM Lépték: 10 μm



19. ábra 1 μM cilindrospermopszin hatásának időfüggése A) 24 h B) 48 h C) 72 h, Lépték: 10 μm

Áttérve a másik vizsgált cianotoxinra, a mikrocisztin-LR-re, 24 órás inkubációs idő után 20 μ M alatti koncentráció tartományban nem tudtunk megfigyelni jelentős szerkezetbeli változásokat. Erőteljes fillopódium képződést észleltünk 20 μ M-nál (20.B ábra), míg 50 μ M MC-LR esetében a sejtek 85%-a lekerekedett állapotban volt, a stresszrostok eltűnését figyelhettük meg (20.C ábra).





20. ábra A mikrocisztin-LR hatása a CHO-K1 sejtek aktin rendszerére 24 órás expozíció után A) kontroll B) 20 μ M, C) 50 μ M, Lépték: 10 μ m



21. ábra 5 μ M MC-LR hatásának időfüggése: A) 24 h B) 48 h C) 72 h kezelési idő Lépték: 10 μ m

48 órás expozíciós idő után már 5 μM MC-LR koncentrációnál is eltérést figyeltünk meg a kontrollhoz képest: az aktin filamentumok a sejtmembrán alá koncentrálódnak, a sejtmag körüli aktin hálózat elkezd depolimerizálódni (21.B ábra), míg 72 órás kezelési idő után a mikrofilamentek további redukciója illetve sejtmag körüli koncentrálódása figyelhető meg. (21.C ábra). A kromatin a kondenzálódás következtében erősebben festődik DAPI-val, mint a kontroll sejtek sejtmagjában.

Cilindrospermopszin esetében csak kevés irodalmat találunk a sejtek mikrofilamentáris elemeire gyakorolt hatásairól. Fessard és Bernard (2003) szintén CHO-K1 sejteket kezelt 0.5 és 1 µg·ml⁻¹ CYN-nal és ez a sejtek lekerekedését, a kérgi aktin szétszerelődését és "blebinget" eredményezett.



rágcsálók Α mikrocisztinek májsejtjeinek citoszkeletális morfológiájára és ultrastruktúrájára kifejtett hatásait már számos publikációban leírták (Billam és mtsai., 2008; Eriksson és mtsai., 1990; Ito és mtsai., 1997; Khan és mtsai., 1995; 1996; Toivola és Eriksson, 1999), valamint hasonló hatást detektáltak halak esetében (Li és mtsai., 2001; Pichardo és mtsai., 2005) is. Primer humán hepatocitákon szintén kimutatták, hogy a mikrocisztin-LR indukálja az aktin hálózat összeomlását már nanomoláros mennyiségben is (Batista és mtsai., 2003). Hepatocitákon kívül egyéb sejttípusokon is kimutattak toxikus hatást: patkány vese epitheliális sejteken, valamint bőr fibroblaszt sejteken, illetve majom vesesejteken is (Alverca és mtsai., 2009; Khan és mtsai., 1995). Wickstrom és munkatársai (1995) különböző sejttípusokon tesztelte a MC-LR citoszkeletális elemekre gyakorolt hatását és azt tapasztalta, hogy kezdetben az aktin filamentumok a sejtek plazmamembránjába koncentrálódnak, majd további folyamatos aggregációja illetve kollapszusa figyelhető meg és végül egy denz perinukleáris aktin köteg formájában jelenik meg. Feltételezésük szerint az intermedier filamentumokon bekövetkezett változásoknak a következménye az aktin rendszeren megfigyelt hatás. A mikrofilamentáris rendszer lebomlása feltehetően a protein foszfatázok gátlásának (MacKinthosh és mtsai., 1990; Runnegar és mtsai., 1999), illetve az oxidatív stressznek a következménye (Ding és mtsai., 2000).

4.2.2. A *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek kivonatainak hatása a CHO-K1 sejtek aktin szerkezetére

A kontroll mintában itt is a normális, ép sejtre jellemző szerkezetet figyelhetjük meg (22.A ábra).

24 órás expozíciós idő esetén, 0,2 mg·ml⁻¹ illetve efeletti koncentráció indukált változást a bizonyítottan cilindrospermopszint termelő Cylindrospermopsis raciborskii AQS törzsből készült kivonat. 0,2 mgml⁻¹ koncentrációnál már megfigyelhető volt a kérgi aktin rész erőteljesebb jelölődése (22.C ábra), ami arra utal, hogy az aktin filamentumok újraszerveződnek а kérgi részben. 1 mg[·]ml⁻¹-es koncentrációnál ez még kifejezettebben volt megfigyelhető (22.E ábra). A legtöményebb vizsgált koncentrációnál (2 mg⁻¹) az aktin filamentumok teljes depolimerizációja volt megfigyelhető. Az aktinfilamentumok közvetlenül a kondenzálódott kromatinállomány körül helyezkedtek el (22.F ábra). Ez a 2 mg⁻¹-es extraktum koncentráció 25.4 µg (61.2 nM) cilindrospermopszint tartalmaz (Farkas és mtsai., 2009 publikálás alatt). Ha összevetjük a CYN-nel kapott eredményeinkkel, akkor jól látható, hogy az extraktum esetében kapott festési eredmény CYN esetében az 5 µM-os koncentrációnál kapottakkal mutat egyezést. Ez is alátámasztja eddigi eredményeinket, miszerint az extraktum valószínűleg az egyéb jelenlévő káros komponensek miatt toxikusabb a tisztított hatóanyagnál.



22. ábra AQS *C. raciborskii* izolátum hatása a CHO–K1 sejtek aktin szerkezetére 24 órás expozíciós idő mellett. A) kontroll B) 0,1 mg ml⁻¹ C) 0,2 mg ml⁻¹ D) 0,5 mg ml⁻¹ E) 1 mg ml⁻¹ F) 2 mg ml⁻¹ koncentrációjú cianobaktérium kivonat, Lépték: 10 μ m

A balatoni izolátumok közül az ACT 9502 és az ACT 9505 törzsek hatására fillopódium képződést láthattunk a sejtpreparátumainkon. Az ACT 9502 esetében ez a hatás már 1 mg⁻¹-es koncentráció alkalmazásakor kifejeződött és a sejtmag körül is erőteljesebb festődés mutatkozott (23.B ábra), míg 2 mg⁻¹-es koncentráció esetében a sejtek lekerekedése volt megfigyelhető. 2 mg⁻¹ koncentrációjú cianobaktérium kivonat esetén a sejtek a citokinezist megelőző fázisban dúsultak fel. Kialakult a két utódsejtre jellemző DNS állomány, de a sejt nem tudott kettéosztódni.

Nem figyeltünk meg változást sem 1 mg⁻¹, sem 2 mg⁻¹-es koncentrációjú ACT 9503 kivonat esetében (24. ábra). Mintáink mind a két esetben a kontroll populációra jellemző mikrofilamentáris szerkezetet mutatták: magasan szervezett kortikális aktinhálózat, erősen festődő stresszrostokkal és sűrűbb aktin kötegekkel a sejtperiférián (24. ábra).

A Balatonból izolált négy cianobaktériumból készült kivonat közül a mikrofilamentáris rendszerben bekövetkezett változások tekintetében a legnagyobb változást az ACT 9504-es törzsszámú *C. raciborskii* okozta. Már 1 mg^{-nl⁻¹} kivonat koncentráció indukálta az aktin filamentek szétszerelődésének folyamatát, a stressz rostok depolimerizációját, mely a sejtek lekerekedésében nyílvánult meg, (25.B ábra). Ahogy azt a 25.C ábra is mutatja, 2 mg^{-nl⁻¹} kivonat alkalmazása már egészen rövid filamentumokat eredményezett.

ACT 9505 kivonattal történt kezelés után megfigyelhettük az aktin filamentumok sejtmag körüli területekre történő koncentrálódását és összeomlását 2 mg⁻ml⁻¹-es koncentrációnál (26.B-C ábra).



23. ábra Az ACT 9502 *C. raciborskii* izolátum hatása a CHO–K1 sejtek aktin szerkezetére 24 órás expozíciós idő mellett. A) kontroll B) 1 mg·ml⁻¹ C) 2 mg·ml⁻¹ koncentrációjú cianobaktérium kivonat, Lépték: 10 μm



24. ábra ACT 9503 *C. raciborskii* izolátum hatása a CHO–K1 sejtek aktin szerkezetére, A) kontroll B) 1 mg ml⁻¹ C) 2 mg ml⁻¹ koncentrációjú cianobaktérium kivonat, Lépték: 10 μ m


25. ábra ACT 9504 *C. raciborskii* izolátum hatása a CHO–K1 sejtek aktin szerkezetére. A) kontroll, B) 1 mg·ml⁻¹ C) 2 mg·ml⁻¹ koncentrációjú cianobaktérium kivonat, Lépték: 10 μm



26. ábra Az ACT 9505 *C. raciborskii* izolátum hatása a CHO–K1 sejtek aktin szerkezetére, A) kontroll B) 1 mg·ml⁻¹ C) 2 mg·ml⁻¹ koncentrációjú cianobaktérium kivonat, Lépték: 10 μ m

Eredményeink hűen tükrözik a *C. raciborskii* változékonyságát, sokféleségét. Ismeretes, hogy ezen cianobaktérium fajnak vannak olyan izolátumai melyek képesek cilindrospermopszint illetve fehérjeszintézist gátló anyagokat (Griffiths és Saker, 2003), vagy éppen PSP toxinokat termelni (Lagos és mtsai., 1999), míg más törzsei egyáltalán nem bizonyulnak toxikusnak, vagy még nem sikerült azonosítani a hatóanyagot. Stucken és mtsai. (2009) - az általunk is vizsgált ACT 9502-es törzs mellett - Ausztál elterjedésű *C. raciborskii* törzsek genetikai variabilitását és genomstrukturáját vizsgálták és eredményeik szerint nem figyelhető meg összefüggés a toxicitás fenotipikus megnyilvánulása és a filogenetikai rokonság között.

Vehovszky és munkatársai (2009) *Lymnaea stagnalis*on kimutatták, hogy az ACT 9502-es és ACT 9505-ös izolátumok kolinerg agonista hatással bírnak, ezért anatoxin-a szerű hatóanyag jelentét feltételezik ezen törzsekben. Az ACT 9502-es törzsről Kiss és munkatársai (2002) már korábban leírták, hogy anatoxin-a szerű hatást vált ki a mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) központi idegrendszerén. Farkas és munkatársai (2007) sórák (*Artemia salina*) akut toxicitási teszttel igazolták, mindegyik - általam is vizsgált - Balatonból izolált *C. raciborskii* törzs toxikus voltát és esetükben is az ACT 9504-es *C. raciborskii* törzs kivonata bizonyult a legtoxikusabbnak.

A kivonataink a sejt és az extracelluláris mátrix közti kapcsolat felborulását is kiválthatták. A kivonataink olyan anyago(ka)t tartalmazhatnak, mely gátolhatja a sejtek kitapadását a felülethez. Terveink között szerepel a kivonatok különböző extracelluláris mátrix alkotókra kifejtett hatásának tanulmányozása. Továbbá felmerült, hogy az aktinkötő fehérjékre kifejtett hatást is érdemes lenne monitorozni, mivel ezen fehérjék jelentősen befolyásolják a mikrofilamentumok sejten belüli szerveződését.

4.3. A CHO-K1 sejtek mikrotubuláris rendszerének változásai

4.3.1. A tisztított cianotoxinok hatása a sejtek mikrotubulus rendszerének szerveződésére

A cianotoxinok okozta mikrofilamentáris változások felvetették a citoszkeleton másik jellegzetes komponensének, a mikrotubuláris rendszernek az érintettségét is.

Cilindrospermopszinnal kezelve a CHO-K1 sejtjkultúráinkat az alábbi eredményeket kaptuk a mikrotubuláris rendszer immuncitokémiai vizsgálata során. Jelentős szerkezetbeli változást 24 órás expozíciós idő után 2 μ M-nál (27.C ábra) és ennél nagyobb cilindrospermopszin koncentrációtól tudtunk kimutatni. A cilindrospermopszin koncentráció emelése a tubulin polimerek egységeire történő szétszerelődését jelentősen növelte, 10 μ m-os tartományban már csak a nukleusz körül figyelhettünk meg némi tubulin jelenlétére utaló jelet (27.E ábra).

24 órás expozíciós idő mellett alacsony, nanomólos koncentrációtartományban a MC-LR hatástalan volt, nem detektáltunk változást. Legalacsonyabb hatást kiváltó koncentrációnak a 10 μ M bizonyult, ezen esetben figyelhettünk meg elsőként a mikrotubuláris szerkezet változásait: a tubulusok hossza csökkent, a sejtek kevésbé terültek szét (28.C ábra), mint a kontroll populációbeliek. 20 μ M-nál a tubulin dimerek a sejtmag köré tömörültek, maszkírozva a dezintegrálódó sejtmag állományának DAPI festését (28.D ábra), míg 50 μ M-os koncentrációnál már a sejtmag állomány teljes szétesését tapasztaltuk (28.E ábra).



27. ábra A cilindrospermopszin hatása a CHO-K1 sejtek tubulin szerkezetére A) kontroll B) 1 μ M C) 2 μ M D) 5 μ M E)10 μ M CYN koncentráció, Lépték: 10 μ m



28. ábra A CHO-K1 sejtek tubulin szerkezetében bekövetkezett változások 24 órás, különböző koncentrációjú mikrocisztin-LR-rel történő kezelés után A) kontroll B) 1 μ M, C) 10 μ M D) 20 μ M E) 50 μ M, Lépték: 10 μ m

A mitózis szakaszában lévő sejteknél CYN hatására Beyer és munkatársai (2009) gyakran figyeltek meg tripoláris mitotikus orsókat, melyek az anafázisban hibás testvérkromoszóma szétválást eredményeztek. A CYN okozta protein szintézis gátlás kiválthatja a mikrotubulusok újraszerveződését, melynek során a tubulusok eloszlása a sejt számára egy

69

kevésbé energiafogyasztó formát vesz fel (Baluska és mtsai., 1995). Beyer és munkatársai (2009) western blott eljárással kimutatták, hogy CYN kezelés hatására a β tubulin mennyisége nő, vagyis a cilindrospermopszin a tubulin szintézisét nem befolyásolja, hanem csak annak összeszerelődését és/vagy stabilitását.

A mikrocisztin-LR a mikrotubulusok kollapszusát váltja ki. Wickstrom és munkatársai (1995) különböző sejttípusokon kimutatta, hogy MC-LR hatására a mikrotubulusok aggregálódnak és a sejtmag és/vagy a mikrotubulus organizáló centrum köré asszociálódnak. A sejtváz szerveződésének szabályozása alapvetően foszforilációs/defoszforilációs lépések segítségével történik. A mikrocisztin-LR-ről tudjuk, hogy a protein foszfatáz 1 és 2A erős inhibítora és mind a citoszkeletális mind egyéb citoszolikus fehérjék hiperfoszforilálódását okozza (Eriksson és mtsai., 1989). A mikrotubulus asszociált fehérjék (MAP-ok) foszforilálódása szintén befolyásolja a mikrotubulusok polimerizációját (Brugg és Matus, 1991).

Eredményeink szerint mindkét toxin hatással volt a CHO-K1 sejtek mikrotubuláris állományának szerkezetére.

4.3.2. A *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek kivonatainak hatása a sejtek mikrotubulus rendszerének szerveződésére

A C. raciborskii CYN termelő AQS törzse is változást indukált a Hasonlóan а mikrofilamentumokon tubulin szerkezetben. kapott eredményeinkhez, itt is már 0,2 mg ml⁻¹-es kivonattal kezelt sejteken szerkezetbeli változást: dimerek észleltünk jelentős а tubulin depolimerizációját (29.C ábra). Ez a jelenség 1 illetve 2 mg⁻ml⁻¹-es 70

cianobaktérium kivonat koncentrációnál még kifejezettebb (29. E-F ábra). Megfigyelhető, a sejtmagok méretének drasztikus csökkenése, a fokozott kromatin kondenzálódás, melynek méréke arányos a cianobaktérium kivonat koncentrációjával. A 29.F ábrán látható fokozott mértéká kromatin kondenzálódás arra utal, hogy a *C. raciborskii* AQS törzs valószinűleg egyéb, eddig nem azonosított apoptotikus hatású komponens(eke)t tartalmaz.



29. ábra Az AQS cianobaktérium kivonat (24 h) jelenlétének hatása a sejtek mikrotubuláris szerkezetére A) kontroll sejt B) 0,1 mgml⁻¹ C) 0,2 mgml⁻¹ D) 0,5 mgml⁻¹ E) 1 mgml⁻¹ F) 2 mgml⁻¹ koncentrációjú AQS kivonat Lépték: 10 μ m

71



30. ábra *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9502-es kivonat hatása a CHO-K1 sejtek mikrotubuláris rendszerére A) kontroll B) 1 mg ml⁻¹ C) 2 mg ml⁻¹ kivonat koncentráció, Lépték: 10 μm

Az ACT 9502-es törzset vizsgálva azt találtuk, hogy a sejtek a citokinézis kezdeti fázisában megállnak. A sejtek, normál körülmények között rövid időszakot töltenek ebben a fázisban. 2 mg⁻¹- kivonatot tartalmazó minta esetén a kontroll populációhoz képest szignifikánsan megnőtt az olyan sejtek száma, melyeknél "bab" illetve "súlyzó" alakú sejtmagokat figyelhettünk meg. 2 mg⁻¹-es koncentrációnál már kifejezettebben nyílvánul meg a tubulin szálak depolimerizációja is (30.C ábra).

Amennyiben a sejtkultúránkat az ACT 9503-as törzsszámú *C. raciborskii* izolátumból készült kivonattal kezeltük, 24 órás expozíciós idő alatt még a magasabb vizsgált koncentráció esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változást a mikrotubuláris rendszerben. Ez az izolátum bizonyult a legkevésbé toxikusnak a tubulin rendszeren kifejtett hatást tekintve (31. ábra). A mikrotubulusok dinamikus átrendeződése változatlanul folyt.

A CHO-K1 sejtek az ACT 9504-es törzzsel kezelve a korábban a mikrofilamentáris rendszernél tapasztaltakhoz hasonlóan itt is koncentráció és időfüggő módon a mikrotubulusok szétszerelődését illetve a sejtek

aggragációját váltotta ki. Csökkent a mikrotubulusok denzitása, a még meglévőek a sejtmag köré lokalizálódtan figyelhetőek meg (32. ábra).



31. ábra *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9503 kivonat hatása a CHO-K1 sejtek mikrotubuláris rendszerére A) kontroll B) 1 mg·ml⁻¹ C) 2 mg·ml⁻¹ kivonat koncentráció, Lépték: 10 μ m



32. ábra *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9504 kivonat hatása a CHO-K1 sejtek mikrotubuláris rendszerére A) kontroll B) 1 mg ml⁻¹ C) 2 mg ml⁻¹ kivonat koncentráció, Lépték: 10 μ m



33.ábra *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9505-ös kivonat hatása a CHO-K1 sejtek mikrotubuláris rendszerére A) kontroll B) 1 mg·ml⁻¹ C) 2 mg·ml⁻¹ kivonat koncentráció, Lépték: 10 μ m

Jelentős szerkezetbeli változást indukált az ACT 9505-ös törzsszámú *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátum is (33. ábra). A tubulin szálak depolimerizációja már 1 mg⁻ml⁻¹–es koncentrációnál bekövetkezett a 24 órán át tartó expozíció során. Ennél nagyobb koncentrációnál is ezt a hatást tapasztaltuk.

Toxikus hatás esetén valószínűleg stresszfehérjék asszociálódnak a tubulin szálakhoz, melyek befolyásolják annak szerveződését. Ezen stresszfehérjék expressziójának kvantifikálása olyan esetben, mikor a toxinok vagy kivonatok tubuláris károsodásokat okoznak, további kutatások tárgyát képezhetik.

4.4. A CHO-K1 sejtek tejsav-dehidrogenáz (LDH) enzim aktivitásának változásai

Cianobaktérium toxinok és kivonataik hatását citotoxicitási vizsgálatokban előszeretettel határozzák meg a sejtek tejsav dehidrogenáz enzimének aktivitására kifejtett hatásával (Carbonell és mtsai., 2004; Battle és mtsai., 1997). Jelen munkánkban mi is ezt a módszert alkalmaztuk a vizsgált toxinjaink és cianobaktérium törzseink esetében esetlegesen kifejtett membrán permeabilitás változás kimutatására.

4.4.1. A tisztított cianotoxinok hatása a sejtek LDH enzimaktivitására és EC_{50} értéke

A cilindrospermopszin LDH aktivitásra gyakorolt hatása 3 órás kezelési idő esetében koncentrációfüggőnek bizonyult. Érdemes

megfigyelni, hogy a 3 órás kezelés esetében szignifikánsan (p = 0.01) nőtt az enzimaktivitás, míg 24 órás expozíciós idő mellett csökkent (34. ábra). 3 órás kezelés után a cilindrospermopszin az 1 µM-os koncentrációban a maximálisan felszabadítható LDH 50%-át felszabadította. 24 órás kezelés utáni enzimaktivitás csökkenést azzal magyarázhatjuk, hogy a cilindrospermopszin a vizsgált koncentráció tartományokban, már hamarabb felszabadította az összes LDH-t, az LDH valószínűleg az inkubátorban lévő hőmérsékleten elbomlott. Mivel a cilindrospermopszin már 3 óra alatt elérte a maximálisan felszabadítható LDH mennyiséget, így esetében 3 órára vonatkoztatva adjuk meg a probit analízis alapján kapott EC₅₀ értéket, ez $0.00108893 \text{ mg} \text{ml}^{-1}$.



34. ábra A CYN hatása a CHO-K1 sejtek enzimaktivitására 3 é-s 24 órás expozíciós idő után. 3 órás kezelési idő mellett a felszabaduló LDH mennyisége koncentráció függvényében szignifikánsan nőtt p=0,01.

mikrocisztin-LR hatása a cilindrospermopszinhoz képest А késleltetett. Három óra után a sejtek LDH aktivitása végig a kontroll érték körül maradt, nem változott a koncentráció függvényében (35. ábra). Huszonnégy óra után, MC-LR hatására az LDH aktivitás a koncentrációval arányosan szignifikánsan nőtt (p < 0,005) (35. ábra). A 20 µM-os mikrocisztin-LR oldat feleltethető meg azon toxinmennyiségnek, ami CHO-K1 sejtkultúrából a maximálisan felszabaditható LDH-nak körülbelül 50%át juttatja az extracelluláris környezetbe sejtmembrán a áteresztőképességének következtében. Mivel a MC-LR csak 24 órás expozíciós idő után mutatott hatást, ezért 24 órára vonatkoztatva adtuk meg az EC₅₀ értékét, mely $0.013803843 \text{ mg} \text{ml}^{-1}$.



35. ábra MC-LR hatása a CHO-K1 sejtek LDH aktivitására 3 és 24 órás expozíciós idő esetén

Hepatocitáknál 18 órás 1 μ M CYN-nal és e feletti koncentrációkkal történő kezelések 75%-os LDH felszabadulást váltottak ki (Humpage és mtsai., 2005). Cilindrospermopszint intraperitoneálisan adagolva 24 órás inkubációs idő mellett 2 mg⁻¹ LC₅₀ értéket állapítottak meg egereknél (Shaw és mtsai., 2000).

A CHO-K1 sejteken kapott eredményeinkhez hasonlóan, hepatocitáknál sem figyeltek meg 10 μ M MC-LR hatására három óra után szignifikáns LDH koncentráció növekedést pedig ekkor a sejtek egy része már elpusztult, ami arra utalhat, hogy a sejtek a membrán sérülése nélkül is az apoptotikus útra léptek. A membrán károsodásának egyedüli jele a buborékok megjelenése volt (Battle és mtsai., 1997).

Botha és mtsai. (2004) hasonló hatásokat figyeltek meg CaCo2 és MCF-7 sejteken 50 µM MC-LR hatására: ők már 30 perc után megfigyelték az LDH aktivitás növekedését, mely a MC-LR-rel való kezelés következtében felszabaduló oxigén reaktív gyökök hatásának eredményeként tudható be. 24, 48 és 72 órás kezelések esetén ők is az LDH aktivitás szignifikáns növekedését figyelték meg, ami a membrán permeabilitás növekedésének a következménye. A membránok védelme különösen fontos, mert mérsékelt stresszben "csak" az áteresztőképességük nő (például LDH kerül ki az extracelluláris térbe), de nagyobb stressz esetén ez a kettősrétegű membrán teljesen felbomlik és a sejt halálához vezet.

4.4.2. A cianobaktérium kivonatok hatása a CHO-K1 sejtek LDH enzim aktivitására és EC_{50} értékük

A bizonyítottan cilindrospermopszint termelő AQS törzs már 3 óra után szignifikáns LDH aktivitásnövekedést váltott ki a kivonat koncentrációjának a függvényében. Már a legkisebb vizsgált koncentráció esetében is szignifikáns eltérést muttott (p=0.004). 24 órás kezelést követően a kapott LDH mérés eredményei ugyanazt az elosztást mutatják, amit korábban a cilindrospermopszin esetében láthattunk (36. ábra). Ennek magyarázata az enzim pH-tól, hőmérséklettől függő inaktiválódási idejének változásában lehet. Mivel az LDH méréseink alapján az AQS törzs toxikus hatása hasonló a CYN-hez, ez esetben is 3 órás kezelésre számolva adjuk meg az EC₅₀ értéket, mely 0,472716 mg⁻¹ a CHO-K1 sejtkultúránkra vonatkoztatva (2. táblázat).



36. ábra A *C. raciborskii* AQS extraktum hatása az LDH enzimaktivitásra 3 és 24 órás expozíciós idő esetén.

Az ACT 9502-es törzs szignifikáns LDH enzim aktivitás növekedést váltott ki a 24 órás kezelésnél (37.A ábra). Az ACT 9503 szintén csak 24 órás expozíciós idő után okozott szignifikáns LDH enzimaktivitás növekedést (37.B ábra). Az ACT 9504 bizonyult a balatoni cianobaktérium törzseink közül a legtoxikusabbnak, mindkét vizsgált inkubációs idő esetén szignifikáns LDH enzimaktivitás növekedést okozott (37.C ábra). Az ACT 9505 szintén csak 24 órás kezelési idő után váltott ki a kontrollhoz képest szignifikáns enzimaktivitás változást (37.D ábra).



37. ábra A *C. raciborskii* extraktumok hatása az LDH enzimaktivitásra 3 és 24 órás expozíciós idő esetén.

Mind a két kezelési időre kiszámoltuk a balatoni kivonatok EC_{50} értékeit, melyet a 2. táblázat tartalmaz. A táblázatban feltüntettük a két vizsgált toxin és az AQS törzs EC_{50} értékeit is.

A balatoni *C. raciborskii* törzsek közül az ACT 9504 és az ACT 9502 EC_{50} értéke volt a legkisebb 24 órás expozíciós idő után. Az ACT 9504 EC_{50} értéke 24 órás kezelés esetén közelítette azt az értéket, amit az AQS esetében kaptunk 3 órás kezelés után. Az ACT 9503 és ACT 9505 megközelítően azonos EC_{50} értéket mutattak. Mindegyik cianobaktérium kivonat EC_{50} értéke nagyságrendekkel nagyobb, mint a tisztított toxinoké.

Vizsgált	EC_{50} értékek (mg·ml ⁻¹)	
toxin/izolátum neve	3 órás kezelés	24 órás kezelés
CYN	0,0010889 (2,6µM)	-
MC-LR	-	0.013803843 (µM)
AQS	0,472716	-
ACT 9502	0,9067706	0,7076288
ACT 9503	1,9953529	1,6544805
ACT 9504	2,1934997	0,4546839
ACT 9505	2,202327	1,5406595

2. táblázat A CYN, MC-LR, és a *C. raciborskii* AQS, ACT 9502, ACT 9503, ACT 9504, ACT 9505 törzsek EC_{50} értéke CHO-K1 sejtkultúrán

A toxinokra kapott mások méréséhez képest kapott magasabb EC_{50} érték azzal magyarázható, hogy ezen toxinok elsősorban a májsejtekre hatnak, míg mi CHO-K1 sejteken vizsgáltuk hatásukat, illetve határoztuk meg EC_{50} értéküket. Bouaicha és Maatouk (2004) a MC-LR LC₅₀ értékét 48 ng^{-nl⁻¹}-nek állapította meg primer patkány hepatocita tenyészeten. A balatoni izolátumokból készült extraktumok közül a legtoxikusabb mintának ez esetben is az ACT 9504-es törzs bizonyult, majd az ACT 9505, ACT 9502 és végül az ACT 9503 következett.

A későbbiekben ezen törzsek mellett további cianobaktériumtörzsek toxicitását is vizsgálni kívánjuk a CHO-K1 sejtkultúrán, valamint ezen cianobaktérium törzsek további modelleken *in vivo* körülmények közötti monitorozását: nagy mocsári csigán (*Lymnaea stagnalis*), sórákon (*Artemia salina*) valamint zebradánió (*Danio reiro*) embrión.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánkban a Föld édes és sós vizeiben egyaránt előforduló két cianobakteriális toxin (cilindrospermopszin és mikrocisztin-LR), valamint egy ausztrál és 4 hazai *Cylindrospermopsis raciborskii* cianobaktérium törzsből készült kivonat citotoxikusságának eredményeit ismertetjük. Jelen disszertációban leírt eredmények összefoglalását az első fejezetben felsorolt célkitűzésekkel összhangban mutatjuk be.

a) A cianotoxinoknak és cianobaktérium kivonatoknak a kromatin struktúrára kifejtett hatásának bemutatása előtt a kezeletlen kontroll sejtek kromatin szerkezetét vizsgáltuk. Az elutriálással szinkronizált, frakcionált kontroll sejtpopulációkat - fluoreszcens mikroszkóp és áramlási citométer segítségével - elemezve megállapítottuk, hogy a sejtciklus egyes fázisainak milyen kromatin szerkezetek felelnek meg. Ennek az elképzelésnek megfelelően a kromatin-állomány kondenzálódásának folyamata során megkülönböztethetőek voltak különböző morfológiai állapotok, melyek jól tükröződnek a sejtek, sejtmagok nagyságában, illetve a DNS mennyiségben is.

A G1 és korai S fázis tipikus formái a dekondenzált homályos bolyhos, fátyolszerű képletek, illetve kezdetleges szupertekercselt alakzatok is előfordulnak már a középső S fázis felé haladva. A középső S fázis tipikus képletei a szalagszerű eukromatin rostok. További szupertekercselődések révén már vastagabb prekromoszómákat figyeltünk meg, a késői S és G2 fázisokban, majd legvégül a mitózisra jellemző metafázisos kromoszómákat detektáltunk.

Megállapítottuk, hogy a vizsgált cianotoxinok közül a cilindrospermopszin 0,5 koncentrációban még nem, viszont már 1 µM koncentrációtól kezdődően jelentősen befolyásolta a kondenzálódását. kromatin állomány А logaritmikus növekedésben lévő sejtkultúránkban a sejtek többsége az S (60-65%) volt. sejteknek fázisban Ezeknek а a kromatinállományban 1 µM cilindrospermopszin hatására lyukszerű képződményeket figyelhettünk Hasonló meg. jelenséget tapasztaltunk korábbi kísérleteinkben is, ahol kadmiummal kezeltünk CHO-K1 sejteket (Bánfalvi és mtsai. 2005). 2 µM-os koncentrációnál fibrózus, torz, fragmentálódott kondenzált prekromoszómákat figyelhetünk meg. A kromatin szerkezetében tapasztalt genotoxikus hatás még így is megkülönböztethető volt. Míg a kadmium által keletkezett lyukak mélyek és szabálytalan alakúak voltak, éles törésvonallal rendelkeztek, addig a cilindrospermopszin által okozott üregek felszínesebbek, széleik kromatin lekerekítettebb formával rendelkeztek.

Amennyiben a sejteket kisebb koncentrációjú MC-LR-rel kezeltük (2-10 µM), az nem indukált szignifikáns változást a maganyag kondenzálódásában, a tipikus alakzatok, mint a fátyol, a fonal, a szupertekercselt kromatin, a prekromoszómák és a kromoszómák, mind megfigyelhetőek voltak. 20 µM-os felfelé koncentrációtól azonban már változásokat detektálhettunk: a MC-LR jelentősen befolyásolta a kromatin kondenzálódás folyamatát, a sejtek a késői interfázis és a mitózis korai stádiumában rekedtek, mely gyakran nyilvánult meg 83

abnormálisan hiperkondenzálódott kromoszómák, törött elongálódott prekromoszómák formájában. 50 μM-os koncentráció esetén már csak apoptotikus rögöket tudtunk megfigyelni.

A bizonyítottan CYN tartalmú AQS törzs toxikus volta jól tükröződött a kromatinállományon végzett méréseink eredményeiben. Megállapítottuk, hogy a sejtciklus kezdeti fázisára jellemző felhőszerű képletek csak nagyon alacsony számban fordultak elő. A legtöbb sejt a középső S és G2 fázis állapotában volt a kromatinállomány kompaktságának tekintve. Erre a stádiumra jellemző domináns struktúrák a szupertekercselt kromatinrostok és az apoptotikus rögök. Hasonlóan a tisztított cilindrospermopszinnal kapott eredményekhez, kromoszómákat itt sem detektáltunk a mintáinkban.

Áttérve a balatoni cianobaktérium izolátumokból készült kivonatokra, az ACT 9502-es törzsszámú *C. raciborskii* a G1, korai S sejtciklus állapotoknál nem váltott ki változást, megfigyelhettük a kezdeti felhő jellegű szerkezeteket majd a szupertekercselődést. A késői S fázisban eltérést tapasztaltunk: erőteljesebb széli kondenzálódás volt jelen. A mitózis fázisára jellemző prekromoszómákat és kromoszómákat szintén láthattunk.

Az ACT 9503-as törzs nem okozott változást a kromatin kondenzálódás folyamatában, minden egyes sejtciklus szakaszban a neki megfelelő kromatin alakzatot sikerült megfigyelnünk.

A balatoni törzseink közül az ACT 9504-es *C. raciborskii* izolátum indukálta a legnagyobb változást a kromoszómák kialakulásának folyamatában. A G1 és korai S fázisokra jellemző képletek módosultak: a kromatinállomány hólyagszerű lefűződésének kezdeményeit láthattuk. A szintézis fázisban már teljesen szétszakadt kromatinállományt figyelhettünk meg, megszűnt a kromatinállomány folytonossága és nem tapasztaltuk azt a szupertekercselődést, tömörödést sem, amit a kontroll sejtek kromatinállományánál már megszokhattunk. Kromoszómákat csak ritkán lehetett megfigyelni.

A *C. raciborskii* ACT 9505-ös izolátuma szintén nem váltott ki eltérést a kromatin kondenzálódás folyamatában az általunk használt vizsgálati módszer szerint.

 b) b/1. A tisztított cilindrospermopszin idő és koncentrációfüggő módon a sejtkultúráink mikrofilamentáris rendszerének depolimerizálódását okozta. 24 órás expozíció során már 1 μMnál nagyobb toxin koncentráció indukálta az aktinfilamentumok lebomlását.

A mikrocisztin–LR 24 órás expozíciós idő esetén 20 μ M alatti koncentráció tartományban nem okozott szerkezetbeli változásokat. 20 μ M-nál erőteljes fillopódium képződést észleltünk, míg 50 μ M esetében a sejtek nagy része lekerekedett állapotban volt, a stresszrostok depolimerizálódását figyelhettük meg. Itt is megfigyelhető volt az idő és koncentrációfüggés. 48 illetve 72 órás kezelési után már 5 μ M-os mikrocisztin-LR tartalmú médium elegséges volt a toxikus hatás kimutatásához.

Toxicitás tekintetében számottevően hatásosabbnak bizonyult az AQS kivonat, mint a tiszta toxin. 24 órás kezelési idő után már 0,1 mg ml⁻¹ kivonat koncentráció beinditotta az aktin szálak depolimerizációját és a sejtek kezdték elveszíteni jellegzetes megnyúlt alakjukat. Ez 0,5 és 1 mg⁻¹ kivonat koncentrációnál még kifejezettebb, a sejtek lekerekedtek, a aktin kortikális filamentumok a sejtmag közelébe koncentrálódtak. 2 mg·ml⁻¹-es koncentrációnál a teljes mértékű depolimerizáció bekövetkezett, csupán a sejtmag körül lokalizálódott pár filamentum.

A hazai törzsek közül az ACT 9502 1 mg⁻¹-es koncentrációban akadályozta a sejtek felülethez való kitapadását, ami erőteljes fillopodiumképzésben, valamint a sejtek lekerekedésében nyilvánult meg. 2 mg^{-ml⁻¹}-es koncentrációnál a sejtek nagy hányada lekerekedve, a citokinezist megelőző állapotban volt megfigyelhető, az aktin filamentumok a sejtmag köré lokalizálódtak.

Az ACT 9503-as jelű *C. raciborskii* izolátum nem okozott jelentős változást a normális mikrofilamentumok eloszlásában, a stresszrostok a kérgi aktinrésszel mindvégig megfigyelhetőek voltak. Minimális lekerekedést tapasztaltunk 2 mg⁻ml⁻¹–es koncentrációnál.

A *C. raciborskii* ACT 9504 törzse bizonyult az aktinszerkezeten kiváltott változások tekintetében a leghatásosabbnak. Már 1 mg⁻ml⁻¹ kivonat koncentráció kiváltotta az aktin filamentek depolimerizálódását, a stressz rostok lebontását, mely a sejtek lekerekedésében nyilvánult meg.

Végezetül az ACT 9505 *C. raciborskii*-ból készült kivonat szintén az aktin filamentek depolimerizációját indukálta 2 mg⁻ml⁻¹-es koncentrációnál, ami meglepetésnek bizonyult, hiszen a kromatin állomány kondenzálódását nem befolyásolta ez a kivonat.

b/2. A cilindrospermopszin hatásának vizsgálata során a hörcsög sejtek mikrotubuláris szerkezete jelentősen megváltozott 24 órás idő és 2 µM-os koncentráció expozíciós esetén. А cilindrospermopszin koncentráció emelése a tubulincsövecskék depolimerizációját jelentősen növelte, 10 µM-os tartományban már csak a nukleusz körül figyelhettünk meg némi tubulin jelenlétére utaló jelet. A másik vizsgált cianotoxin, a mikrocisztin-LR esetén 10 µM-os koncentrációnál figyelhettünk meg elsőként szerkezetbeli változásokat a 24 órás expozíciós idő alatt: a tubulusok hossza csökkent, a sejtek kevésbé kiterültek, mint a kontroll populációbeliek. 20 µM-os MC-LR koncentrációnál a tubulin filamentumok a sejtmag köré lokalizálódtak, míg 50 µM-os koncentrációnál már a sejtmag állomány sérülését is észlelhettük.

A bizonyítottan CYN-t termelő AQS törzs már 0,2 mg⁻ml⁻¹-es kivonat koncentrációnál beindította a mikrotubulusok depolimerizálódását, magasabb koncentrációnál pedig már egészen a centriólumok közelébe lokalizálódtak a tubulusok, illetve a tubulusokat felépítő dimerek.

Az ACT 9502-es törzset vizsgálva 1 mg⁻¹–es koncentrációnál a tubulusok rövidülését figyelhettük meg, míg a 2 mg⁻¹ kivonatot tartalmazó minta esetén szignifikánsan 87 megnőtt a "bab" illetve "súlyzó" alakú sejtmaggal rendelkező sejtek száma, illetve további depolimerizáció volt megfigyelhető.

Ebben az esetben sem bizonyult az ACT 9503-ös balatoni izolátum toxikusnak. A magasabb vizsgált koncentrációnál is csak minimális depolimerizációra utaló, enyhén rövidebb tubulusok mutatkoztak.

A CHO-K1 sejteket az ACT 9504-es törzsből készült kivonattal kezelve itt is koncentráció és idő függő módon a mikrotubulusok szétszerelődését, illetve a sejtek aggregációját váltotta ki. Csökkent a sejtenkénti mikrotubulusok denzitása, illetve a még meglévők a sejtmag köré lokalizálódtak.

Jelentős szerkezetbeli változást indukált az ACT 9505-ös törzsszámú *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátum extraktuma is. A tubulusok depolimerizációja már 1 mg⁻ml⁻¹–es koncentrációnál megfigyelhető volt a 24 órás kezelési idő után.

c) A cilindrospermopszin LDH enzimaktivitásra gyakorolt hatása mind 3 mind 24 órás kezelési idő esetében koncentrációfüggőnek bizonyult. A 3 órás expozíció esetén szignifikánsan (p < 0,01) nőtt az enzimaktivitás, míg 24 órás kezelés eredményes az LDH lebomlása miatt értékelhetetlen volt. Probit analízissel meghatároztuk a cilindrospermopszin CHO-K1 sejteken mutatott EC₅₀ értékét, ami 0.00108893 mg^{-nl-1}-nek bizonyult.

Mikrocisztin–LR-rel kezelve a sejteket 3 órás expozíció esetén a sejtek LDH aktivitása végig a kontroll érték körül maradt, nem változott a koncentráció függvényében. 24 óra után, MC-LR hatására az LDH aktivitás a koncentráció függvényében 88 szignifikánsan nőtt (p<0,005). A 20 μ M-os mikrocisztin-LR oldat a maximálisan felszabaditható LDH-nak körülbelül 60%-át szabaditja fel. A CHO-K1 sejtkultúránk esetében a LDH enzimaktivitási adatokból Probit analízissel számolt EC₅₀ érték 0.013803843 mg·ml⁻¹.

A bizonyítottan toxikus AQS cianobaktérium törzs extraktuma szintén már 3 óra alatt jelentős LDH enzimaktivitás változást indukált. 24 órás expozíciós időt vizsgálva hasonló LDH aktivitás csökkenést észleltünk, mint a CYN esetén.

A balatoni izolátumokból készült extraktumok esetében az LDH aktivitás változás 24 órás expozíciós idő után kifejezettebb. A hazai izolátumok közül a legtoxikusabb mintának ez esetben is az ACT 9504-es törzs bizonyult, majd az ACT 9505, ACT 9502 és legkisebb mértékben az ACT 9503. Probit analízissel meghatározva az EC₅₀ értéket a következő értékeket kaptuk: ACT 9502: 0.71 mg⁻¹, ACT 9503: 1.65 mg⁻¹, ACT 9504: 0.45 mg⁻¹, ACT 9505: 1,54 mg⁻¹.

Konklúzió

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a cianotoxinok koncentráció-dependens módon megváltoztatják a CHO-K1 sejtek kromatin kondenzációjának folyamatát, a citoszkeleton (mikrofilamentáris és mikrotubuláris) struktúráját, valamint a sejtmembrán permeabilitását. Ezen eredmények CYN esetében a toxin protein szintézist gátló hatásával magyarázhatók, míg MC-LR esetében annak protein foszfatáz gátló képességével.

A C. raciborskii-ből készült kivonatok az általunk végzett különböző tesztekben eltérő toxicitásúaknak bizonyultak. A vizsgált 4 paraméter (kromatinkondenzáció, mikorfilamentáris és mikrotubuláris alapján rendszeren kifejtett hatás, illetve a sejtmembrán integritásának vizsgálata LDH enzimaktivitás változásának mérésével) az egyes törzsek eltérő hatásokat mutattak. Mindegyik tesztben toxikusnak bizonyult а bizonyítottan CYN-t termelő AQS törzs, a balatoni izolátumok közül pedig az ACT 9502-es és az ACT 9504-es. A toxicitás mértéke az AQS törzsnél volt a legnagyobb, mely ismert toxin (CYN) tartalmával magyarázható. AQS kivonat esetében toxikusabb hatást kaptunk, mint annak toxintartalma szerint elvártuk. Ennek hátterében az állhat, hogy a kivonatokban lévő különböző anyagok között szinergesztikus hatás léphet fel. Ezért célszerű nem csak a tisztított toxinok, hanem a kivonatok toxicitását is jellemezni. A két hazai törzs közül az ACT 9504 toxicitása kifejezettebb volt, mint az ACT 9502, mind a kromatin kondenzálódás, mind a mikrofilamentáris rendszer tekintetében. Közepesen toxikusnak bizonyult az ACT 9505-ös törzs és legkevésbé toxikusnak pedig az ACT 9503-as. A kivonatokban lévő hatóanyag(ok) még nem ismertek, így pontos hatás mechanizmusukat sem tudjuk leírni. A mai napig kísérletek folynak a kivonatokban lévő toxikus anyagok azonosítása céljából.

Az általunk használt különböző tesztek valamennyien alkalmazhatóak voltak a tisztított cianotoxinok és a cianobaktérium kivonatok toxicitásának monitorozására. Valamennyi alkalmazott módszert külön-külön és kombinációban is javasoljuk a cianotoxinok és cianobakteriális kivonatok gyors toxikológiai elemzésére.

6. SUMMARY: COMPARATIVE STUDY ON THE EFFECTS OF CYANOTOXINS AND CYANOBACTERIAL EXTRACTS IN CHO-K1 CELLS

The contamination (pesticides, heavy metals, biotoxins) of the Earth's surface waters and its consequences are common problems nowadays. The eutrophication has become more widespread in '50 years, it has caused deteriorations in aquatic environment and serious problem for water use. It pays attention to the monitoring the phytoplankton and cyanobacterial occurence, abundance and distribution. Cyanotoxins may have an impact not only on phyto- and zooplanktons, but also on higher plants, animals and human also. They can cause diseases such as gastroenteritis, hepatomegaly, kidney and spleen diseases, liver cancer, skin irritation or allergic reactions. There are a lots of reports about appearance of cyanobacterial-blooming makes worth to study and to monitor the toxicity of cyanobacterium strains responsible for mass production in Lake Balaton.

The aim of our study was to monitor the toxic effects of different cianotoxins (cylindrospermopsin (CYN) and microcystin-LR (MC-LR)) and extracts of an Australian and four Hungarian *C. raciborskii* strains on CHO-K1 cells. It is known there are several *C. raciborskii* isolates, which have been proven to be toxic both to cell cultures and in mouse bioassay as well, however none of them contained known toxins (Fastner *et al.*, 2003). The experimental results presented in this thesis are summarised below:

a) We prepared first synchronised cell populations of CHO-K1 cells by counter flow centrifugal elutriation. These populations were examined with fluorescent microscopy and were analysed by FACS. We observed different morphological stages during the chromatin condensation which is reflected both in the size of the cells, cell nuclei and their DNA content. In the early stages of S phase the DNA was highly decondensed and appeared as a fuzzy, veil like chromatin structure. Later in the early S phase the chromatin began to turn into supercoiled structures. In the mid-S phase the supercoiled, ribboned chromatin turned into chromatin fibers. These fibers folded into elongated prechromosomes in the later S and G2 phases and during the mitosis into metaphase chromosomes. These different condensation forms could be clearly distinguished and visualized in control CHO-K1 cells.

We have observed that at concentrations of cylindrospermopsin equal to and higher than 1 μ M had a significant effect on the chromatin condensation. Chromatin of middle S phase cells generated a hole-like structure upon CYN treatment. We have observed earlier similar structures when CHO-K1 cells were treated with cadmium (Banfalvi *et al.*, 2005). Fibrous, distorted forms, fragmented condensed perchromosomes were the most abundant when the cells were treated with 2 μ M CYN.

When CHO-K1 cells were treated with lower (2-10 μ M) concentration of microcystin-LR no significant changes were observed in chromatin condensation. All typical structures were seen: veil, string, ribbon, chromatin bodies, prechromosomes and metaphase chromosomes. MC-LR caused remarkable changes at 20

 μ M or higher concentration: the cell-cycle was blocked in late interphase and early phase of the mitosis. This was manifested as abnormal forms: broken elonged prechromosomes, hypercondensed chromosomes and apoptotic bodies.

The visualization of chromatin structures in nuclei of CHO-K1 cells was also used to reflect the toxicity of CYN in AQS strain. We have observed only a few cloud or veil-like chromatin structures which are typical features of early S phase. Most of the chromatin structures resembled those characteristic to late S and G2 phases with supercoiled chromatin ropes and apoptotic bodies. We did not observed chromosomes like the case of CYN.

Extract of the ACT 9502 did not cause noticable difference regarding the typical chromatin forms such as veil-like structures, elongated prechromosomes and metaphase chromosomes. However strong margination of condensed chromatin reflected the accumulation of roped chromatin structures characteristic to mid and late S phase.

The ACT 9503 strain didn't induce any changes during the chromatin condensation. We could see all typical structures in every phase in our samples.

The ACT 9504 *C. raciborskii* strain induced the most significant changes among the isolates of Balaton during chromatin condensation. In the G1 and early S phases typical structutres were changed: we observed polarized chromatin vesicles detached from the main chromatin. In the synthesis phase we could only seen entirely disrupted chromatin, the chromatin's continuity was broken

and we did not see folding, supercoiling. Only a few metaphase chromosomes were seen.

Neither the ACT 9505 isolate nor the ACT 9503 caused changes during chromatin condensing.

b) b/1. The CYN caused time- and concentration- dependent depolymerisation of microfilaments in CHO-K1 cells. 24 hours exposure to 1 μ M or higher toxin concentration induced the actin depolymerisation.

MC-LR treatments for 24 hours at lower than 20 μ M concentration did not induce changes in the microfilament system. At 20 μ M concentration we noticed strong filopodium formation and at 50 μ M MC-LR concentration the cells were rounded in shape and all the stessfibers were depolymerised. We found that the toxins effects were dependent on time and concentration. Longer exposure for 48 and 72 hours evoked the toxic effects at as low as 5 μ M MC-LR concentration.

After 24 hours treatment with 0,1 mg·ml⁻¹ the CYN producing AQS extract initiated the detachment from the surface and the loss of their elongated shape. These characteristics were more pronounced in cells exposed to 0,5 and 1 mg·ml⁻¹ AQS extracts: cells rounded up, cortical actin fibers were concentrated around the nucleus. Disintegration of actin filaments was even more evident when cells were subjected to treatment with 2 mg·ml⁻¹ extract causing the microfilaments collapse near the nucleus.

Treatment for 24 hours with 1 mg ml⁻¹ extract of ACT 9502 strain inhibited the attachment of the cells to the surface, caused round cell shape. After treatment with 2 mg ml⁻¹ actin was present $_{94}$

only around the nuclei loosing its filamentous organization and many nuclei were about to reach the stage of cytokinesis.

ACT 9503 treatment did not cause significant changes in the microfilaments, the stress fibers with the cortical actin were also clearly visible. Minimal rounding up of cells was observed at 2 mg⁻ml⁻¹ extract concentration.

Among the *C. raciborskii* strains isolated form Lake Balaton tested the ACT 9504 strain was the most toxic for the microfilament system of our cell cultures. 1 mg^{-nl⁻¹} extract caused actin depolymerisation, stress fibers depolymerisation and cell rounding. The ACT 9505 extract caused the actin depolymerisation with 2 mg^{-nl⁻¹} too. This came as a surprise as this strain did not induce changes in the chromatin condensation.

b/2. The CYN had a strong effect also on the hamster cell's microtubular system. Its depolymerisation was observed at 2 μ M and 24 hours treatment: 10 μ M caused fast depolymerisation in the cytoplasm and somewhat weaker effect near the nucleus.

In the case of MC-LR we found changes in the microtubular system originally with 10 μ M treatment and 24 hour exposure: such as decreased in the length of the tubuli and detachment cells from the surface. 20 μ M caused the tubulin to depolymerisation and its dimer localisation near the nucleus. Treatment with 50 μ M MC-LR caused not only the depolymerisation of tubulin but also the chromatin damage.

CYN producing AQS strain started depolymerisation of tubulin after 0,2 mg⁻ml⁻¹ treatment and a higher concentrations

destroyed completely the microtubular structure with the notable exception of centrioles.

ACT 9502 also stopped the cells cycle in the early stages of the citokinesis. We observed the shortening of tubuli when the cells were exposed to 1 mg ml⁻¹ extract and further shortening could be seen upon treatment with 2 mg ml⁻¹ and increased the number cells with dumbbell like nucleus.

The ACT 9503 strain proved to be non-toxic. Higher concentrations of the extracts resulted only in somewhat shorter tubuli.

The toxic effects of ACT 9504 were dependent on the time and concentration. It caused the disassembling of microtubules and the aggregation of cells. The number of tubuli in a cell decreased and their remnants were polarized around the nucleus.

Significant morphological changes were induced by ACT 9505 strain's extracts. Depolymerisation of the tubuli had been shown after 24 hour exposure with 1 mg·ml⁻¹extract.

c) The effect of CYN on the leakage of LDH was dose dependent on both 3 and 24 hours exposure. 3 hours exposure increased the enzyme activity significantly (p < 0,01) but subsided after 24 hours. Probit analysis allowed to determine the EC_{50} value of CYN on CHO-K1 cells which was 0.00108893 mg^{-nl⁻¹}.

CHO-K1 cells treated with MC-LR for 3 hours did not show changes in the LDH activity and corresponded to the control value. After 24 h exposure induced significant increases in LDH activity. We calculated the EC_{50} value using Probit analysis which turned out to be 0.013803843 mg·ml⁻¹.

The AQS strain extract caused a significant increase of LDH activity, after 3 hours exposure. After 24 hours the LDH activity was decreasing.

All strains isolated from Lake Balaton caused significant LDH leakage after 24 hours. The most toxic strain was the ACT 9504, followed by ACT 9505, ACT 9502 and the least toxic was ACT 9503. Their EC_{50} values were the following: ACT 9502: 0.71 mg ml⁻¹, ACT 9503: 1.65 mg ml⁻¹, ACT 9504: 0.45 mg ml⁻¹, ACT 9505: 1,54 mg ml⁻¹.

Conclusion:

Our results clearly show that the cyanotoxins have effects on chromatin condensation, on cytoskeleton structure (both microfilamentary and microtubular system) and on membrane permeability in a concentration and time dependent manner. These results can be explained in the case of CYN by its ability to inhibit protein sythesis and the effects of MC-LR can be traced back to its protein phosphatase inhibitory effects.

The toxic effects of the extracts from *C. raciborskii* strains were various at the different tests. The strains showed different effects on the four investigated parameters mentioned above. The CYN producing AQS strain, the ACT 9502, ACT 9504 strains isolated from Lake Balaton proved to be toxic in all tests. The level of the toxicity was the highest in AQS and was due to its CYN content. However, the toxicity of the extract obtained from AQS was much higher than expected taking into consideration its CYN content. This extract could contained several other metabolites beside not excluding the possibility of their synergestic impact on CYN's toxicity.

Based on our results we suggest a monitoring system consisting of several test which proved to be useful not only for purified cyanotoxins and recommend their application in a more economic and time saving manner for extracts of algae isolated from lakes such as the Balaton. The ACT 9504 was the most toxic among the strains isolated from Lake Balaton, followed by ACT 9502 and even less toxic ACT 9505 and the least toxic was ACT 9503. As the chemical analysis of the composition and distribution of toxic metabolite(s) in the extracts have not been done yet so far we are not able to explain the individual mechanism of toxicity. Experiments are in progress to identify these toxic compounds.

Finally all our methods were proved to be useful monitoring the toxicity of purified cyanotoxins and cyanobacterial extracts. We suggest all methods (separately or together) for their rapid toxicity analysis to estimate the toxicity of cyanotoxins and cyanobacterial extracts of lakes and waterways.

7. IRODALMI JEGYZÉK

- Akasofu S, Kimura M, Kosasa T, Ogura H, Sawada K (2006) Protective effect of donepezil in primary-cultured rat cortical neurons exposed to N-methyl-D-aspartate (NMDA) toxicity. Eur J Pharmacol 530:215-222.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robets K, Walter P (2008) Molecular Biology of the cell 5.ed. Garland Science Taylor and Francis Group, New York, USA,1053-1075.
- Allera C, Lazzarini G, Patrone E, Alberti I, Barboro P, Sanna P, Melchiori A, Parodi S, Balbi C (1997) The condensation of chromatin in apoptotic thymocytes shows a specific structural change. The J Biol Chem 272:10817-10822.
- Alverca E, Andrade M, Dias E, Sam Bento F, Batoreu MC, Jordan P, Silva MJ, Pereira P (2009) Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line. Toxicon 54:283-294.
- Amorim A, Vasconcelos V (1999) Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon 37:1041-1052.
- Ayaydin F, Vissi E, Mészáros T, Miskolczi P, Kovács I, Fehér A, Dombrádi V, Erdődi F, Gergely P, Dudits D (2000) Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. Plant J. 23:85-96.
- Azevedo SMFO, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M (1994) 1st report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis-Aeruginosa*. J Appl Phycol 6:261-265.
- Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK (2002) Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicology 181-182:441-446.
- Baluska F, Barlow PW, Hauskrecht M, Kubica S, Parker JS, Volkmann D (1995) Microtubule arrays in maize root cells. Interplay between the cytoskeleton nuclear organization and post-mitotic cellular growth patterns. New Phytol 130:177-192.
- Bánfalvi G, Sooki-Tóth A, Sarkar N, Csuzi S, Antoni F (1984) Nascent DNA chains synthesized in revesibly permeable cells of mousethymocytes. Eur Journal Biochem 139:553-559.

- Bánfalvi G (2004) Molekuláris sejtbiológia, Kossuth kiadó, Debrecen, Hungary
- Bánfalvi G, Gácsi M, Nagy G, Kiss ZB, Basnakian AG (2005) Cadmium induced apoptotic changes in chromatin structure and subphases of nuclear growth during the cell cycle in CHO cells. Apoptosis 10:631-642.
- Bánfalvi G, Nagy G, Gácsi M, Rőszer T, Basnakian AG (2006) Common pathway of chromosome condensation in mammalian cells. DNA Cell Biol 25:295-301.
- Bánfalvi G (2008) Chromatin fiber structure and plectonemic model of chromosome condensation in *Drosophila* cells. DNA Cell Biol 27:65-70.
- Bánfalvi G (2008) Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. Nature Protocols 3:663-673.
- Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A (1997) Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (*Cyanophyceae*) isolated from Lake Kinneret, Israel. J Phycol 33:613-616.
- Batista T, de Sousa G, Suput JS, Rahmani R, Suput D (2003) Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. Aquat Toxicol 65:85-91.
- Battle T, Touchard C, Moulsdale HJ, Dowsett B, Stacey GN (1997) New cell substrates for *in vitro* evaluation of microcystin hepato-cytotoxicity. Tox in Vitro 11:557-567.
- Bernard C, Harvey M, Briand JF, Bire R, Krys S, Fontaine JJ (2003) Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. Environ Toxicol 18:176-186.
- Beyer D, Surányi G, Vasas G, Roszik J, Erdődi F, M-Hamvas M, Bácsi I, Bátori R, Serfőző Z, Szigeti ZM, Veréb G, Demeter Z, Gonda S, Máthé C (2009) Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured *in vitro*. Toxicon 54:440-449.
- Billam M, Mukhi S, Tang L, Gao W, Wang JS (2008) Toxic response indicators of microcystin-LR in F344 rats following a single-dose treatment. Toxicon 51:1068-1080.
- Botha N, Gehringer MM, Downing TG, van de Venter M, Shepard EG (2004) The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CAco2 cells. Toxicon 43:85-92.

- Bouaicha N, Maatouk I (2004) Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. Toxicol Lett 148:53-63.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.
- Brautigan DL (1994) Protein phosphatases. Recent Prog Horm Res 49:197-214.
- Brugg A, Matus A (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. J Cell Biol 114:735-743.
- Bryant DA (1994) The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 881
- Carbonell GV, Falcon R, Yamada AT, da Fonseca BA, Yano T (2004) Morphological and intracellular alterations induced by *Serratia marcescens* cytotoxin. Res Microbiol 155:25-30.
- Carmichael WW (1997) The cyanotoxins. Adv Botanic Res 27:211-256.
- Carmichael WW, Eschedor JT, Patterson GM, Moore RE (1988) Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L575 from New Zealand. Appl Environ Microbiol 54:2257-2263.
- Cazenave J, Wunderlin DA, Bistoni MDL, Ame MV, Krause E, Pflugmacher S, Wiegand C (2005) Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus, Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis* A field and laboratory study. Aquatic Toxicol 75:178-190.
- Chiswell RK, Shaw GR, Eaglesham G, Smith MJ, Norris RL, (1999)Seawright AA, Moore MR "Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition". Environ Toxicol 14:155-161.
- Choi BW, Namikoshi M, Sun F,Reinhart KL, Carmichael WW, Kaup AM, Evans WR, Beasley VR (1993) Isolation of linear peptides related to the hepatotxins nodularin and microcystins. Tetrahodon Lett 34: 7881-7884.
- Chorus I, Bartram J (1999) Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. Für WHO durch E & FN Spon /Chapman & Hall, London, 416.
- Codd GA, Bell SG, Kaya K, Ward CJ, Beattie KA, Metcalf JS (1999) Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. European Journal of Phycology 34:405-415.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J Immunol Methods 115:61-69.
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN (1999) Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. Mutat Res 442: 69-77.
- Ding WX, Shen HM, Ong CN (2000) Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. Environ Health Perspect 108:605-609.
- Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Flood L, Wang S, Hubbs A, Luster MI (1998) Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. Toxicol Appl Pharmacol 151:359-366.
- Ehrenhofer-Murray AE (2004) Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair, Eur J Biochem 271:2335–2349.
- Engstrom-Ost J, Lehtiniemi M, Green S, Kozlowsky-Suzuki B, Viitasalo M (2002) Does cyanobacterial toxin accumulate in mysid shrimps and fish via copepods? J Exp Marine Biol Ecol 276:95-107.
- Entz G, Kottász J, Sebestyén O (1937) Quantitatív tanulmányok a Balaton bioszesztonján. Annal Biol Tihany 9:1-144.
- Eriksson JE, Meriluoto JA, Kujari HP, Osterlund K, Fagerlund K, Hallbom L (1989) Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. Toxicon 26:161-166.
- Eriksson JE, Gronberg L, Nygard S, Slotte JP, Meriluoto JA (1990) Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. Biochim Biophys Acta 1025:60-66.
- Eriksson JE, Paatero GI, Meriluoto JA, Codd GA, Kass GE, Nicotera P, Orrenius S (1990) Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. Exp Cell Res 185:86-100.
- Estes JE, Selden LA, Kinosian HJ, Gershman LC (1992) Tightly-bound divalent cation of actin. J Muscle Res Cell Motil 13:272-284.
- Falconer IR, Hardy SJ, Humpage AR, Froscio SM, Tozer GJ, Hawkins PR (1999) "Hepatic and renal toxicity of the blue-green algae (cyanobacterium): *Cylindrospermosis raciborskii* in male swiss albino mice". Environ Toxicol 14:143–150.

- Falconer IR, Humpage AR (2001) Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. Environ Toxicol, 192-195.
- Farkas A, Kovács WA, Paulovits G, Vehovszky Á (2007) Balatoni és Kisbalatoni kékalgák toxikusságának vizsgálata. Hidr Közl 87:28-30.
- Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, Chorus I (2003) Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. Toxicon 42:313-321.
- Fay P, Van Baalen G (1987) The cyanobacteria, Elsevier science Publishers, Amsterdam, 534.
- Fergusson KM, Saint CP (2000) Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. Appl Environ Microbiol 66:4145-4148.
- Fergusson KM, Saint CP (2003) Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. Environ Toxicol 18:120-125.
- Fessard V, Bernard C (2003) Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. Environ Toxicol 18:353-359.
- Fewer DP, Rouhiainen L, Jokela J, Wahlsten M, Laakso K, Wang H, Sivonen K (2007) Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. BMC Evol Biol 7:183.
- Fladmark KE, Serres MH, Larsen NL, Yasumoto T, Aune T, Doskeland SO (1998) Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. Toxicon 36:1101-1114.
- Fotakis G, Timbrell JA (2006) In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett 160:171-177.
- Francis G (1878) Poisonous Australian Lake. Nature (London), 18, 11-12
- Froscio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR (2003) Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. Environ Toxicol 18:243-251.
- Gácsi M, Antal O, Vasas G, Máthé Cs, Borbély G, Saker ML, Győri J, Farkas A, Vehovszky A, Bánfalvi G (2009) Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. Toxicol In Vitro 23:710-718.

- Gehringer MM (2004) Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. FEBS Lett, 557:1-8.
- Gorzó GY, Kiss G (1985) Néhány heterocisztás cianobaktérium populációdinamikája a Balatonban Hidr Közl 65:181-186.
- Griffiths DJ, Saker ML (2003) The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. Environ Toxicol 18:78-93.
- Grigoryev SA, Arya G, Correll S, Woodcock CL, Schlick T (2009) Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. PNAS 106: 3317-13322.
- G.-Tóth L, Padisák J (1986) Meteorological factors affecting the bloom of *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. (Cyanophyta: Hormogonales) in the shallow Lake Balaton, Hungary. J Plankton Res 8:353–363.
- Gupta N, Pant SC, Vijayaraghavan R, Rao PV (2003) Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. Toxicology 188:285-296.
- Guzman RE, Solter PF, Runnegar MT (2003) Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. Toxicon 41:773-781.
- Harada KI, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K (1994) Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon 32:73-84.
- Hawkins PR, Runnegard MTC, Jackson ARB, Falconer IR (1985) Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. Journal of Appl Environ Microbiol 50: 1292–1295.
- Hawkins PR, Chandrasena NR, Jones GJ, Humpage AR, Falconer IR (1997) Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. Toxicon 35:341-346.
- Hegewald E, Jeeji-Bai N, Hesse M (1975) Taxonomische und floristische Studien an Planktonalgen aus ungarischen Gewässern. Algolog Stud 13:392–432.
- Herfindal L, Oftedal L, Selheim F, Wahlsten M, Sivonen K, Doskeland SO (2005) A high proportion of Baltic Sea benthic cyanobacterial isolates contain apoptogens able to induce rapid death of isolated rat hepatocytes. Toxicon 46:252-260.

- Hiripi L, Nagy L, Kalmár T, Kovács A, Vörös L (1998) Insect (*Locusta migratoria migratorioides*) test monitoring the toxicity of cyanobacteria. Neurotoxicology 19:605–608.
- Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M, Boynton AL (1990) J Biol Chem 265:19401-19404.
- Hortobágyi T, Kárpáti I (1967) Nagyméretű vízvirágzás a Balaton délnyugati részén. Bot Közl 54:137
- Hubert JJ (1980) Bioassay, Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, Iowa
- Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR (2000) Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. Mutat Res 472:155-161.
- Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR (2005) Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrom P-450 and oxidative stress. J Toxicol Environ Health 68:739-753.
- Istvánffy Gy (1987) A Balaton moszatflorája [Algal flora of Lake Balaton]. A Balaton Tudományos Tanulmányozásának eredményei II: 2/1, 1-141.
- Ito E, Kondo F, Harada K (1997) Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. Toxicon 35:231-239.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, de Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VS, Azevedo SM, Jarvis WR (1998) Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. N Engl J Med 338:873-878.
- Kankaanpaa HT, Holliday J, Schroder H, Goddard TJ, von Fister R, Carmichael WW (2005) Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia-a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. Toxicol Appl Pharmacol 203:243-256.
- Khan SA, Ghosh S, Wickstrom M, Miller LA, Hess R, Haschek WM, Beasley VR (1995) Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells. Nat Toxins 3:119-128.
- Khan SA, Wickstrom ML, Haschek WM, Schaeffer DJ, Ghosh S, Beasley VR (1996) Microcystin-LR and kinetics of cytoskeletal reorganization in hepatocytes, kidney cells, and fibroblasts. Nat Toxins 4:206-214.

- Kiss T, Vehovszky A, Hiripi L, Kovács A, Vörös L (2002) Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 131:167-176.
- Kol E (1938) Die Algenvegetation des Balatonsees. Ann Biol Tihany 11:154-160.
- Kós P, Gorzó G, Surányi G, Borbély G (1995) Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant-tests (*Sinapis-Alba L*). Anal Biochem 225:49-53.
- Lagos N, Onodera H, Zagatto PA, Andrinolo D, Azevedo SM, Oshima Y (1999) The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. Toxicon 37:1359-1373.
- Lakshmana Rao PV, Bhattacharya R, Parida MM, Jana AM, Bhaskar ASB, (1998) Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* UTEX 2385 induced DNA damage in vivoand in vitro, Environ Toxicol Pharmacol 5:1–6.
- Lankoff A, Krzowski L, Glab J, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S, Wojcik A (2004) DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. Mutat Res 559:131-142.
- Lankoff A, Wojcik A, Lisowska H, Bialczyk J, Dziga D, Carmichael WW (2007) No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation. Toxicon 50:1105-1115.
- Lewin B, Cassimeris L, Lingappa VR, Plopper G (2007) Cells, Jones and Bartlett Publishers, Inc.USA, 388
- Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Mahakhant A, Noparatnaraporn N, Yongmanitchai W, Kaya K, Watanabe MM (2001) Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). Toxicon 39:973-980.
- Luger K (2003) Structure and dynamic behavior of nucleosomes. Curr Opin Genet Dev 13:127-135.
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Lett 264:187-192.

- Máthé C, Beyer D, Erdődi F, Serfőző Z, Székvölgyi L, Vasas G, M MH, Jámbrik K, Gonda S, Kiss A, Szigeti ZM, Surányi G (2009) Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. Aquat Toxicol 92:122-130.
- McDermott CM, Nho CW, Howard W, Holton B (1998) The cyanobacterial toxin, microcystin-LR can induce apoptosis in a variety of cell types. Toxicon 36:1981-1996
- Menezes S, Soares AMVM, Guilhermino L, Peck MR (2006) Biomarker responses of the estaurine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxix stressors: temperature, salinity and handling stress effects. J Exp Marine Biol Ecol 335:114-122.
- Metcalf JS, Barakate A, Codd GA (2004) Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. FEMS Microbiol Lett 235:125-129.
- Mohamed ZA, Carmichael WW, Hussein AA (2003) Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a Microcystis bloom. Environ Toxicol 18:137-141.
- Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW (1989) The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. Nature 339:280-286.
- Németh J, Vörös L (1986) Koncepció és módszertan felszíni vizek algológiai monitoringjához. 135. OKTH, Budapest.
- Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H (1992) Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. J Cancer Res Clin Oncol 118:420-424.
- Norel R, Agur Z (1991) A model for the adjustment of the mitotic clock by cyclin and MPF levels. Science 251:1076-1078.
- Norris RL, Seawright AA, Shaw GR, Senogles P, Eaglesham GK, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR (2002) Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. Toxicon 40:471-476.
- Oláh J, ElSamra MI, Abdel-Moneim MA, Tóth L, Vörös L (1981) Nitrogénkötés halhústermelő ökoszisztémákban [Nitrogen fixation in fish-producing agro-ecosystems]. A halhústermelés fejlesztése 10, HAKI, Szarvas
- Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC (1992) Cylindrospermopsin a potent hepatotoxin from the blue-green-alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. J Am Chemi Soc 114:7941-7942.

- Padisák J, G.-Tóth L, Vörös L (1984) *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. Bloom in Lake Balaton in the summer and autumn of 1982.- BFB-Bericht 51:77-81.
- Pichardo S, Jos A, Zurita JL, Salguero M, Camean AM, Repetto G (2005) The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR. Toxicol In Vitro 19:865-873.
- Pomati F, Moffitt MC, Cavaliere R, Neilan BA (2004) Evidence for differences in the metabolism of saxitoxin and C1+2 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. Biochim Biophys Acta 1674:60-67.
- Porat R, Teltsch B, Perelman A, Dubinsky Z (2001) Diel buoyancy changes by the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from a shallow reservoir. J Plankton Res 23:753-763.
- Preussel K, Stuken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J (2006) First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (*Cyanobacteria*) isolated from two German lakes. Toxicon 47:156-162.
- Présing M., Herodek S, Vörös L, Kóbor I (1996) Nitrogen fixation, ammonium and nitrate uptake during bloom a of *Cylindrospermopsis* raciborskii in Lake Balaton. Arch Hydrobiol 136: 553-562.
- Price TO, Uras F, Banks WA, Ercal N (2006) A novel antioxidant Nacetylcysteine amide prevents gp120- and Tat-induced oxidative stress in brain endothelial cells. Exp Neurol 201:193-202.
- Rao PV, Bhattacharya R (1996) The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. Toxicology 114:29-36.
- Rinehart KL, Harada K-I, Namikoshi M, Chen C, Harvis CA, Munro MHG, Blunt JW, Mulligan PE, Beasley VR, Dahlem AM, Carmichael WW (1988) Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. J Am Chem Soc 110: 8557–8558.
- Rippka R, DeReuelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J Gen Microbiol 111:1–61.
- Runnegar MT, Jackson AR, Falconer IR (1988) Toxicity of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens. Toxicon 26:143-151.
- Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Ge JL, Lu SC (1994) The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid

cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun 201:235-241.

- Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Lu SC (1995) Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. Biochem Pharmacol 49:219-225.
- Runnegar MT, Wei X, Hamm-Alvarez SF (1999) Increased protein phosphorylation of cytoplasmic dynein results in impaired motor function. Biochem J 342:1-6.
- Saker ML, Eaglesham GK (1999) Cylindrospermopsis raciborskii in tissues of the Redclaw crayfish Cherax quadricarinatus. Toxicon 37:1065-1077.
- Saker ML, Metcalf JS, Codd GA, Vasconcelos VM (2004) Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. Toxicon :185-194.
- Sandstrom A, Glemarec C, Meriluoto JA, Eriksson JE, Chattopadhyaya J (1990) Structure of a hepatotoxic pentapeptide from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. Toxicon 28:535-540.
- Satpute RM, Hariharakrishnan J, Bhattacharya R (2008) Alphaketoglutarate and N-acetyl cysteine protect PC12 cells from cyanideinduced cytotoxicity and altered energy metabolism. Neurotoxicology 29:170-178.
- Schembri MA, Neilan BA, Saint CP (2001) Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Environ Toxicol 16:413-421.
- Sebestyén O (1934) "Vízvirágzás" a Balatonon? M Biol Int Munk 7:205-208
- Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, Shawet G (2007) First evidence for the production of cylindrosperopsin and deoxycylindrospermopsin by the frehwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gornot) Speziale and Dyck. Harmful Algae 6:73-80.
- Shaw GR, Seawright AA, Moore MR, Lam PK (2000) Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. Ther Drug Monit 22:89-92.
- Shen X, Lam PK, Shaw GR, Wickramasinghe W (2002) Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. Toxicon 40:1499-1501.
- Sivonen K, Kononen K, Carmichael WW, Dahlem AM, Rinehart KL, Kiviranta J, Niemela SI (1989) Occurrence of the hepatotoxic

cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. Appl Environ Microbiol 55:1990-1995.

- Smith RD, Walker JC (1996) Plant Protein Phosphatases. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:101-125.
- Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepisto L, Metcalf JS, Codd GA, Meriluoto J (2006) First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). Environ Toxicol 21:552-560.
- Stucken K, Murillo AA, Soto-Liebe K, Fuentes-Valdes JJ, Mendez MA, Vasquez M (2009) Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. Syst Appl Microbiol 32:37-48.
- Swanson KL, Allen CN, Arostam RS, Rapoport H, Albuquerque EX (1986) Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. Mol Pharmacol 29:250-257.
- Swedlow JR, Hirano T (2003) The making of the mitotic chromosome: Modern insights into classical questions. Molecular Cell 11:557-569.
- Tamás G (1954) Mennyiségi planktontanulmányok a Balatonon IV. A negyvenes évek fitoplanktonjáról [Quantitative plankton studies on Lake Balaton IV. Phytoplankton for the years 1944–1951]. Ann Biol Tihany 22:95–110.
- Tamás G (1959) Die Kieselalgen vom Plankton des Teiches "Belsőtó" in Tihany. Acta Bot Acad Sci Hung 5:501–505.
- Tamás G (1974) The occurrence of *Rhaphidiopsis mediterranea* Skuja in the plankton of Lake Balaton. Ann Biol Tihany 41:317–321.
- Tamura S, Hanada M, Ohnishi M, Katsura K, Sasaki M, Kobayashi T (2002) Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. Eur J Biochem 269:1060-1066.
- Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, Ito E, Watanabe M (1994) Electron-Microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green-alga Umezakia Natans. Toxicon 32:833-843.
- Toivola DM, Eriksson JE (1999) Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure. Tox in Vitro 13:521-530.
- Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI (2006) Mitotic phosphatases: no longer silent partners. Curr Opinion in Cell Biol 18:623-631.
- VanBuren P, Begin K, Warshaw DM (1998) Fluorescent phalloidin enables visualisation of avtin without effects on myosin actin filament sliding velocity and hydrolytic properties *in vitro*. J Mol Cell Cardiol 30:2777-2783.

- Vasas G, Gáspár A, Pager C, Surányi G, Máthé C, Hamvas MM, Borbély G (2004) Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. Electrophoresis 25:108-115.
- Vasas G, Gáspár A, Surányi G, Batta G, Gyémánt G, M MH, Máthé C, Grigorszky I, Molnár E, Borbély G (2002) Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (blue-green Sinapis test). Anal Biochem 302:95-103.
- Vehovszky A, Ács A, Kovács WA, Szabó H, Győri j, Farkas A (2009) Isolated strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) produce anatoxin-a like neurotoxins. Comp Biochem Physiol Part A 153:588.
- Vörös L (1980) A Balaton fitoplanktonjának tömege, összetétele és diverzitása 1976-ban. Bot Közl 67:25-33
- Vörös L, Vizkelety E, Tóth F, Németh J (1983) Trofitás vizsgálatok a Balaton Keszthelyi medencéjében. Hidr Közl 62:390–395.
- Wolffe A (1995) Chromatin: Structure and function, Academic Press, San Diego
- Zafar RS, Sodja A (1983) Homology between actin coding and its adjacent sequences in widely divergent species. Biochem Biophys Res Commun 111:67-73.
- Zegura B, Zajc I, Lah TT, Filipic M (2008) Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. Toxicon 51:615-623.

8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik a disszertáció elkészítése során segítséget nyújtottak.

Mindenekelőtt a szülőknek, nagyszülőknek, férjemnek szeretnék köszönetet mondani azért a felbecsülhetetlen segítségért, amivel lehetővé tették, hogy minden energiámmal a munkámra figyelhessek, és szeretetükért, amivel kitartásomat megalapozták.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Bánfalvi Gáspár egyetemi tanárnak, hogy állást ajánlott, hasznos tanácsokkal látott el a munkám során, sok érdekes tudományos beszélgetést folytathattam vele.

Köszönöm Dr. Bíró Péternek a Magyar Tudományos Akadémia Balatoni Limnológiai Kutatóintézet tudományos igazgatójának, hogy lehetővé tette a doktori tanulmányaim folytatását.

Köszönöm Dr. Serfőző Zoltánnak, hogy segített az immuncitokémiai módszerek elsajátításában és hasznos tanácsokkal segítette munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Farkas Annának, aki nagy figyelemmel kísérte és bírálta munkámat. Őszinte, kemény kritikusom volt.

Balázsné Vera oldatkészítéssel, Kiss Rózsa irodalmazással járult hozzá a disszertáció alapját képező közlemények megjelenéséhez.

Nem lenne teljes a kép, ha nem említeném kedves tanítványomat, Antal Otíliát, akivel együtt sok izgalmas, új felfedezést éltünk át. Sokat segített fiatalos kedvével, szorgalmával, és örülök, hogy résztvevője lehettem első sikereinek, Országos Tudományos Diákköri szerepléseinek elismeréseiben osztozhattam.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Dr. Győri Jánosnak, hogy a disszertáció elkészítéséhez nyugodt feltételeket biztosított, elképzeléseimet, törekvésemet önzetlenül támogatta.



9. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGÉNEK JEGYZÉKE

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- Gácsi M., Antal O., Vasas G., Máthé Cs., Borbély Gy., Saker M.L., Győri J, Farkas A, Vehovszky Á, Bánfalvi G. (2009): Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. Toxicol In Vitro. 23(4):710-8. IF.: 2,49
- Farkas A, Kovács W. A, Gácsi M, Győri J, Vehovszky Á. (2007): Cianobaktériumok toxikusságának vizsgálata a sórák (*Artemia salina* L.) akut toxicitási teszt alkalmazásával Hidr Közl 87. 6: 28-30)
- 3. Bánfalvi G, Nagy G, **Gácsi M**, Rőszer T, Basnakian AG. (2006): Common pathway of chromosome condensation in Mammalian cells, DNA Cell Biol 25 (5):295-301 IF.: 1,905.
- 4. **Gácsi M.**, Nagy G., Pintér G., Banfalvi G. (2005): Condensation of interphase chromatin in nuclei of synchronized Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells, DNA Cell Biol 24:43-53. IF.: 2,324
- Bánfalvi G., Gácsi M., Nagy G., B. Kiss Zs., Basnakian A. G. (2005): Cadmium induced apoptotic changes in chromatin structure and subphases of nuclear growth during the cell cycle in CHO cells, Apoptosis 10:631-42. IF.: 4,497

∑ IF: 11.216

További közlemények

- Trencsényi G., Kertai P., Somogyi C., Nagy G., Dombrádi Z., Gácsi M, Bánfalvi G. (2007): Chemically induced carcinogenesis affecting chromatin structure in rat hepatocarcinoma cells DNA & cell biology 26 (9):649-655 IF.: 1,905
- 2. Kovács W. A., Felföldi T., Saker L. M., Gácsi M. (2007): *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria)
 - 113

cilindrospermopszin termelő képességének molekuláris vizsgálata *Hidrobiológiai Közlöny*, 87. 6sz. 83-86.

- Gácsi M., Bánfalvi G., Vasas G., Borbély Gy., Győri J., Vehovszky Á.: Effects of cyanobacterial toxins on the chromatin structure and microtubule system of CHO cells, 32 FEBS Congress, Bécs, Ausztria, 2007. július 7-12. Konferencia kiadvány, idézhető absztrakt IF. 3.033
- 4. **Gácsi M.**, Czégény I., Nagy G., Bánfalvi G. (2005): Survival of fish upon removal of cyanide from water. Environmental Research 97:293-99. IF.: 1,79
- 5. Nagy G., **Gácsi M.**, Rehak M., Jenei Z., Rőszer T., Klaisz M., Bánfalvi G. (2004): Gamma irradiation-induced changes in the state of the interphase chromatin is nuclei of murine-pre-B cells. Apoptosis 9:765-76. IF.: 4,54
- 6. **Gácsi, M.,** Bánfalvi, G. (2001): Cyanide detoxification based on the survival of fishes. Acta Biol Debrecina 23, 68-70

∑ IF: 11.268

Konferencia előadások, poszterek

- Gácsi M., Antal O., Győri J., Farkas A., Vehovszky Á.: Cianobaktérium törzsek citotoxicitásának, mikrofilamentáris rendszerre kifejtett hatásának vizsgálata CHO-K1 sejteken, TOX 2008 Magyar Toxikológusok Társaságának Éves konferenciája, Sopron, 2008. október 15-17.
- Vehovszky Á., Kovács W. A., Gácsi M., Szabó H., Győri J., Vasas G., Farkas A.: Cianobaktériumok környezeti hatásának becslése ökotoxikológiai tesztek alapján Tox 2007 Magyar Toxikológusok Társasága Éves Konferenciája, Eger, 2007. október 17-19.
- Gácsi M., Farkas A., Vasas G., Borbély G., Győri J., Vehovszky Á.: Cianobakteriális toxinok hatása a CHO-K1 sejtek kromatin és sejtváz szerkezetére, XLIX. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2007. október 6-8. Tudományos konferencia előadás, poszter

- 4. **Gácsi M**, Bánfalvi G, Vasas G, Borbély Gy, Győri J, Vehovszky Á: Effects of cyanobacterial toxins on the chromatin structure and microtubule system of CHO cells, 32 FEBS Congress, Bécs, Ausztria, 2007. július 7-12.
- Gácsi M, Báthori R, Veréb Z, Győri J, Erdődi F, Serfőző Z: Nitrogén monoxid szintetáz expressziójának változása asszinkron és szinkron tenyészetekben, Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2006. május 4-6.
- Kovács A, Felföldi T, Saker L. M and Gácsi M: Molecular investigation of the toxicity of Cylindorspermopsis Raciborskii (Nostocales, Cyanobacteria) in Lake Balaton (Hungary) using isolated strains and fied samples, Reslim 2006, Brno, 2006. augusztus 27szeptember 2.
- Farkas A, Kovács A, Gácsi M, Győri J, Vehovszky Á: Cianobaktériumok neurotoxicitásának monitorozása *in vitro* és *in vivo* tesztek alkalmazásával Tox 2006 Tudományos Konferencia, Galyatető, 2006. október 4-6
- Kovács A, Felföldi T, Saker L. M, Gácsi M: Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanobacteria) cilindrospermopsin termelő képességének molekuláris vizsgálata XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6.
- 9. Farkas A, Kovács W. A, **Gácsi M**, Győri J, Vehovszky Á: Cianobaktériumok toxikusságának vizsgálata sórák (*Artemia salina*) akut toxicitási teszt alkalmazásával, XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6.

Oktatási segédanyag

Egyetemi jegyzet

B. Kiss Zs., Gácsi M., Nagy G.: Állatélettani gyakorlatok biológus hallgatóknak I. (2004)
B. Kiss Zs., Gácsi M., Nagy G.: Állatélettani gyakorlatok biológus hallgatóknak II. (2005)

Videofilm

B. Kiss Zs., Gácsi M., Nagy G.: Inzulin és adrenalin hatása a házinyúl vércukorszintjére (2005)

Tehetséggondozás

"*Az anatómia, a sejtbiológia és az élettanalapjai*" című tehetséggondozó tanfolyam (2002-2005) előadás, gyakorlat

Antal Otilia Tamara diploma és TDK munkájának témavezetője