

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Gácsi Mariann

Témavezető: Dr. Bánfalvi Gáspár



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola,
Biológia Doktori Program

Debrecen, 2009

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre gyakoribb problémát jelent a Föld felszíni vizeinek szennyeződése (peszticidek, nehézfémek, biotoxinok) 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, ivóvíz 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. A Balaton nemcsak üdülésre és fürdőzésre szolgál, hanem fontos ivóvízbázis is. A múlt század nyolcvanas éveiben súlyos veszélyt jelentett az ivóvíztermelés biztonságára a Balatonban a potenciális toxintermelő cianobaktériumok tömeges elszaporodása (Oláh és mtsai., 1981, Vörös és mtsai., 1983).

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

A Balaton vonatkozásában már 1934-ben történtek közlések az első cianobakteriális tömegprodukcióval kapcsolatban (Sebestyén, 1934). 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 (Gorzó és Kiss, 1985; Padisák és mtsai., 1984; Vörös és mtsai., 1983). 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 monokultúrájává változott (Présing és mtsai., 1996).

Az esetek mind gyakoribb előfordulása, indokoltá 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

Hiripi és munkatársai (1998) halfajokon és vándorsáskán (*Locusta migratoria migratorioides* R.F.) mutatták ki a Balatonban esetenként tömegesen elszaporodó *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena aphanizomenoides*, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska), valamint *Microcystis aeruginosa* fajok tömegtenyészetéből készített kivonatok toxicitását. Az egyes cianobaktériumtörzsek 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 mtsai., 2002), hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* tenyészetéből készített, különbözőképpen tisztított cianobaktérium kivonat-frakciók hatásmechanizmusuk

szerint eltérő komponenseket tartalmazhatnak. Ezek némelyike neurotoxikus hatású, membrán szintjén kifejtett hatása 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 (MC-LR)) valamint cianobakteriális kivonatok (a bizonyítottan cilindrospermopszint termelő *C. raciborskii* törzsből készült kivonat (AQS) és a balatoni *C. raciborskii* izolátumokból (ACT 9502, ACT 9503, ACT 9504, ACT 9505) CHO-K1 sejt kultúrára gyakorolt hatásairól. Ismeretes, hogy bizonyos *C. raciborskii* izolátumok toxikusnak bizonyultak mind sejt kultúrában, mind egereken végzett kísérletek esetében (Fastner és mtsai., 2003), annak ellenére, hogy a szóban forgó törzsek, eddigi tudásunk szerint ismert toxint nem termeltek.

Kimutatták, hogy a cianotoxinok hatást fejtenek ki a sejt vázra, megváltoztathatják a membrán permeabilitását, a különböző enzimek aktivitását módosíthatják, befolyásolhatják a fehérjeszintézist és genotoxikus, rákkeltő hatásuk is lehet. Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Miként játszódik le a kromoszómák kialakulása, milyen szerkezetbeli változások figyelhetők meg a kromatinpreparátumokon, milyen változást indukálnak a cianotoxinok illetve a cianobakteriális kivonatok a kromatin kondenzálódás folyamata során?
- Milyen hatással vannak az előbb említett cianotoxinok és kivonatok a CHO-K1 sejtek mikrotubuláris és mikrofilamentáris rendszerének szerveződésére, és ez hogyan nyilvánul meg?
- Hogyan változik a sejtek permeabilitása, milyen mértékben szabadul fel a CHO-K1 sejtekből laktát dehidrogenáz (LDH) enzim a fentebb megnevezett cianotoxinok és kivonatok jelenlétében?
- Van-e összefüggés, a cianotoxinok illetve cianobaktérium-extraktumok által indukált változások egyes aspektusai - kromatinkondenzáció, a citoskeletális váz, és az LDH enzimaktivitás - között?

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A CHO-K1 sejt vonal jellemzése, fenntartása, alkalmazása

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

A kromatin állomány kondenzálódásával kapcsolatos kísérletekben a CHO-K1 sejt kultúrához T sejt tenyésztő edényeket, míg a citoskeleton vizsgálatához 4 lyukú plate-be helyezett 12 mm átmérőjű steril fedőlemezket használtunk. A LDH enzimaktivitás méréshez a sejteket 1×10^5 -en koncentrációban helyeztük 96 lyukú mikrotiter lemezre. A sejteket a kísérletek elvégzése előtt 24 órával frissen passzáltuk.

2.2. Cianotoxinok és cianobaktérium-kivonatok készítése

Kísérleteinkhez a tisztított cianotoxinokat Prof. Borbély György kutatócsoportja készítette el és bocsátotta rendelkezésünkre.

A cilindropermopszint (CYN) *Aphanizomenon ovalisporum*ból (Forti) ILC-164 nyerték ki, mely törzset 1994-ben Izraelben izolálták a Kinneret tóból (Banker és mtsai., 1997). A toxin tisztítást a korábban már leírtaknak megfelelően készítették el (Vasas és mtsai., 2002;2004). A mikrocisztin-LR-t (MC-LR) *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 törzséből tisztították. Ezt a törzset a Velencei tóból izoláltak 1991-ben (Kós és mtsai., 1995; Vasas és mtsai., 2002; Vasas és mtsai., 2004).

A cianobaktérium tenyészeteket NaNO₃ mentes BG-11-es médiumban tartottuk fent. A kultúráinkat folyamatosan ellenőrzött körülmények között szaporítottuk 22±1 °C-on, 14:10 órás fény: sötét ciklus mellett (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 (Wathman) keresztüli centrifugálással történt. A médiummentes cianobaktérium biomasszáat 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, majd hatékonyságát mikroszkópban ellenőriztük.

2.3. A cianotoxinokkal és cianobaktérium kivonatokkal történő kezelések

Munkánk során a toxinok (CYN és MC-LR) mellett 5 cianobaktérium törzsből készített kivonatot teszteltünk: 4 Balatonból izolált törzs: *Cylindropermopsis raciborskii* izolátumok (ACT 9502, ACT 9503, ACT 9504, ACT 9505) valamint egy bizonyítottan cilindropermopszint termelő törzs: a *Cylindropermopsis raciborskii* (AQS) törzse (Valério és mtsai., 2005).

A toxinokat és a kivonatokat szérumentes F-12/Ham médiumban hígítottuk a megfelelő végkoncentrációig. A kontroll sejteken a kezelések kezdetekor az FBS-t tartalmazó médiumot szintén szérumentesre cseréltük ki.

A vizsgált koncentráció tartomány MC-LR estében 5 μM - 50 μM, míg cilindropermopszin esetében 0,5 μM - 5 μM volt. A kivonatok végkoncentrációi 0,02 - 5 mg·ml⁻¹ voltak. A kezelési időtartamok a következők voltak: kromatin állomány kondenzálódásra gyakorolt hatás felméréséhez 24 óra, a citoszkeletális vizsgálatoknál 24 óra; esetenként 48 és 72 óra kezelést használtunk, míg az LDH enzimaktivitás vizsgálatoknál 3 és 24 óra.

2.4. Szinkronizált sejtek előállítása és ellenőrzése áramlási citométerrel

A sejtek szinkronizálását egy olyan centrifuga rotor segítségével végeztük, melyben a sejtek egy, a centrifugális erővel ellentétes irányú folyadékáramlás hatására méret szerint

választódnak szét, így az azonos sejtciklus fázisba tartozó sejtek külön frakciókba gyűjthetők. A tenyésztett sejtek szüretelését 600 x g centrifugális erővel végeztük 5 percig, majd újra szuszpendáltuk őket 1%-os FBS- tartalmazó F-12/Ham médiumban.

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 sterilizálás végett, a hőmérsékletet 20 °C-ra állítottuk be, majd 10^8 sejtet töltöttünk a JE-5.0 centrifugában lévő elutriáló rotor kamrájába (Beckman Instruments, 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, melyek paramétereit áramlási citométerrel határoztuk meg

A szinkronizált sejteket szobahőmérsékleten fixáltuk 70%-os metanollal, majd $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációjú propidium-jodid oldattal festettük. A festett sejtek tulajdonságait, mint sejttérfogat, sejtszám, sejtmagátmérő, DNS tartalom - C értékben kifejezve (1C érték felel meg egy haploid sejt DNS tartalmának) FACS áramlási citométerrel határoztuk meg. A mérésekhez a Cell Quest szoftvert (Beckton Dickinson) alkalmaztuk.

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

A kontroll és kezelt sejteket reverzibilis permeabilizációnak vetettük alá (Gácsai és mtsai., 2009), majd úgynevezett magnövelő pufferben (50 mM KCl, 10 mM MgSO_4 , 3 mM ditiotritol, 5 mM NaPO_4 , 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 (500 x g, 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 egyszer mostuk foszfát puffer oldattal (PBS), majd hagyományos módon felszálló alkohol sorban (70%, 90%, 95% és 100%) dehidratáltuk. Ezután 25 ng ml^{-1} DAPI-t tartalmazó ANTIFADE-médiummal (90% glicerol, 2% DABCO, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,02% nátrium-azid) fedtük.

Mintáinkat Nikon Optiphot epifluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk, majd Spot programmal digitalizáltuk.

2.6. A citoskeletális változások kimutatása immuncitokémiai eljárással

A toxinok és kivonatok sejtvázra kifejtett hatásának vizsgálatához az aktin komponenseket fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált falloidinnal jelöltük, míg a tubulin rendszer esetében cy3-mal konjugált monoklonális anti- β -tubulin antitestet alkalmaztunk.

A kezelések után a médiumot eltávolítottuk, majd egyszer mostuk foszfát pufferrel (PBS). Az aktin vizsgálatra szánt mintákat 4% paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS-re cseréltük és szobahőmérsékleten 5 percen keresztül rögzítettük, míg a tubulin szerkezeten végzett megfigyelésekhez készített mintákat -20 °C-os metanollal 10 percig és azt követően 10 másodperig -20 °C-os acetonnal fixáltuk. Ezután a sejteket mindkét esetben kétszer mostuk PBS-sel, majd 1:5000-szeresre hígított falloidinhez konjugált FITC-cel festettük az aktinfilamentumokat 3 órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten, míg tubulin esetében a cy3-mal konjugált anti- β -tubulint 1:200 hígításban alkalmazva festettük a sejteket szintén 3 órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten.

Az inkubációs idő letelte után a mintákat kétszer 5 percig öblítettük PBS-sel, majd egyszer desztillált vízzel, majd a sejtmagot DAPI festéssel tettük láthatóvá.

Mintáinkat Nikon Optiphot II. epifluoreszcens mikroszkóp segítségével elemeztük és mintánként 30-30 feltételt készítettünk Spot program segítségével.

2.7. LDH enzimaktivitás vizsgálatok

A méréshez, a mikrotiterlemezbe a kezelési idő lejárta után mindegyik mintából 40 μ l felülszót, 250 μ l NADH oldatot (0,2 mM NADH 0,1 M Tris- NaCl- pufferben pH 7,2 oldva) és 40 μ l piruvátot (10 mM piruvát 0,1 M Tris-NaCl-ban pH, 7,2 oldva) pipettáztunk, majd Victor³ plate olvasó készülékkel 340 nm-en mértük az abszorbancia változást.

Mivel a mintáknak van egy háttér abszorbanciája, ezt minden esetben lemértük és az erre kapott LDH aktivitási értékeket kivontuk a kezelt sejtek esetén kapott LDH aktivitási értékekből. Az így kapott eredményeket, hogy pontosan tudjunk vonatkoztatni a sejtszámra, a mintában 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 felülszó eltávolítása után a sejteket egyszer öblítettük Tris-NaCl pufferrel (pH 7,2), majd 200 μ l feltárpufferben (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 megállapításához, 10 μ l felülszót, 70 μ l Tris-NaCl puffert és 60 μ l 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.

2.8. Statisztika

Eredményeinket Origin7-es program segítségével ábráztuk. 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 analízissel hasonlítottuk össze (Hubert, 1980). Mindegyik esetben kiszámoltuk, hogy a kapott LDH értékek hány százalékát

jelentik a pozitív kontrollnak, majd a megadott táblázat alapján probitanalízissel kiszámoltuk azt az értéket, amely esetén a vizsgált anyag a maximálisan elérhető hatásának 50%-át kiváltja (EC_{50}). Ez alapján össze tudtuk hasonlítani a toxinok és a cianobaktériumkivonatok toxicitását. A kísérletek mindegyikét legalább háromszor megismételtük.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

3.1. Morfológiai változások kromatin kondenzálódás során kontroll és kezelt CHO-K1 sejtek esetében

3.1.1 Kromatin kondenzáció folyamatának morfológiai elemzése a szinkronizált, kontroll CHO-K1 sejtekben

A cianotoxinoknak és cianobaktérium kivonatoknak a kromatin struktúrára kifejtett hatásának bemutatása előtt a kezeletlen kontroll sejtek kromatin szerkezetét vizsgáltuk. Az elutriálással szinkronizált, frakcionált sejtpopulációkat - fluoreszcens mikroszkóp és áramlási citométer segítségével - elemezve megállapítottuk, hogy a sejtciklus egyes fázisainak milyen kromatin szerkezetek felelnek meg. Ennek 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 dekondezált 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 mutattunk ki. Bánfalvi és mtsai. (2006) a kromatin kondenzálódás folyamatának fluoreszcens mikroszkóppal történő vizsgálatát különböző sejtvonalakon K-562-humán leukocita, IM indian muntjac fibroblaszt sejteken is elvégezték és hasonló kromatin struktúrákat figyeltek meg.

3.1.2. Kromatin kondenzációs változások a cianotoxinokkal és cianobaktérium kivonatokkal kezelt CHO-K1 sejtekben

Megállapítottuk, hogy a vizsgált cianotoxinok közül a cilindrospermopszin $0,5 \mu\text{M}$ koncentrációban még nem, viszont már $1 \mu\text{M}$ koncentrációtól kezdődően jelentősen befolyásolta a kromatin állomány kondenzálódását. A logaritmikus növekedésben lévő sejtkulturánkban a sejtek többsége az S fázisban (60-65%) volt. Ezeknek a sejteknek a kromatinállományban $1 \mu\text{M}$ cilindrospermopszin hatására lyukszerű képződményeket figyelhettünk meg. Hasonló jelenséget tapasztaltunk korábbi kísérleteinkben is, ahol kadmiummal kezeltünk CHO-K1 sejteket (Bánfalvi és mtsai., 2005). $2 \mu\text{M}$ -os cilindrospermopszin koncentrációnál fibrózus, torz, fragmentálódott kondenzált

prekromoszómákat figyelhettünk 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 kromatin üregek felszínesebbek, széleik lekerekítettebb formával rendelkeztek. Shaw és munkatársai (2000) egereken mutatták ki a cilindrospermopszinnak illetve metabolitjainak kovalens kötődését a DNS-hez. Beyer és munkatársai (2009) kimutatták nád gyökér sejteken, hogy a $0.5\text{--}5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CYN hatására a korai mitózis szakaszában lévő sejtek aránya megnőtt, míg a metafáziban lévő sejtek aránya csökkent. 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.

Amennyiben a sejteket kisebb koncentrációjú MC-LR-rel kezeltük ($2\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$), 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. $20\text{ }\mu\text{M}$ -os koncentrációnál magasabb koncentrációban a MC-LR jelentősen befolyásolta a kromatin kondenzálódás folyamatát. A sejtek a késői interfázis és a mitózis korai stádiumában rekedtek, mely gyakran nyilvánult meg abnormálisan hiperkondenzálódott kromoszómák, törött elongálódott prekromoszómák formájában. $50\text{ }\mu\text{M}$ -os koncentráció esetén már csak apoptotikus rögöket tudtunk megfigyelni. 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).

A bizonyítottan CYN tartalmú AQS törzs toxikus volta jól tükröződött a kromatinállományon végzett méréseinkben. 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 kompakttságát tekintve. Erre a stádiumra jellemző domináns struktúrák a szupertekercselt kromatinrostok és az apoptotikus rögök. Hasonlóan a tisztított cilindrospermopszinnal kapott eredményekhez, kromoszómákat itt sem detektáltunk mintáinkban.

Áttérve a balatoni cianobaktérium izolátumokból készült kivonatokra, az ACT 9502-es törzsszámú *C. raciborskii* kivonat a G1, korai S sejtciklus állapotoknál nem idézett elő változást, megfigyelhettük a kezdeti felhő jellegű szerkezeteket majd a szupertekercselődést. A késői S fázisban eltérést tapasztaltunk: erőteljesebb széli kromatin kondenzálódás volt észlelhető. 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, az annak megfelelő kromatin alakzatot sikerült megfigyelni.

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. 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 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 kísérletek folynak mind *in vivo* és *in vitro* területen ezen törzsek toxikus hatásáért felelős anyag(ok) azonosításáért (Vehovszky és mtsai., 2009; Farkas és mtsai., 2009 közlésre előkészítve, Antal és mtsai., 2009 közlésre előkészítve).

3.2. Cianotoxinok és cianobaktérium kivonatok hatása a CHO-K1 sejtek mikrofilamentáris rendszerére

3.2.1. Mikrofilamentáris változások a tisztított cianotoxinokkal kezelt CHO-K1 sejtekben

A tisztított cilindrospermopszin idő és koncentrációfüggő módon sejt kultúráink mikrofilamentáris rendszerének depolimerizálódását okozta. 24 órás expozíció során már 1 μM -nál nagyobb toxin koncentráció az aktinfilamentumok lebomlását indukálta. 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 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CYN-nal és ez a sejtek lekerekedését, a kérgi aktin szétszerelődését és „blebbinget” eredményezett.

A mikrocisztin-LR 24 órás expozíciós idő esetén 20 μM alatti koncentráció tartományban nem okozott szerkezetbeli változásokat. 20 μM -nál erőteljes fillopódium képződést észleltünk, míg 50 μM esetében a sejtek nagy része lekerekedett állapotban volt, a stresszrostok depolimerizálódását figyelhettük meg. Itt is kimutatható volt az idő és koncentrációfüggés. 48 illetve 72 órás kezelés után már 5 μM -os mikrocisztin-LR tartalmú médium elégséges volt a toxikus hatás kimutatásához. A mikrocisztinek rágcslók májsejtjeinek citoskeletonális 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), valamint hasonló hatást detektáltak halak esetében (Li és mtsai., 2001; Pichardo és mtsai., 2005) is. A mikrofilamentáris rendszer lebomlása feltehetően a protein foszfatázok gátlásának (MacKintosh és mtsai., 1990; Runnegar és mtsai., 1999), illetve az oxidatív stressznek a következménye (Ding és mtsai., 2000).

3.2.1. Mikrofilamentáris változások a cianobaktérium kivonatokkal kezelt CHO-K1 sejtekben

Toxicitás tekintetében erősebb „méregnek” bizonyult az AQS kivonat, mint a tisztított toxin. 24 órás kezelési idő után már $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ koncentrációjú kivonat beindította az aktin szálak depolimerizációját és a sejtek kezdtek elveszíteni jellegzetes megnyúlt alakjukat. Ez $0,5$ és $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ kivonat koncentrációnál még kifejezettebb, a sejtek lekerekedtek, a kortikális aktin filamentumok a sejtmag közelébe koncentráálódtak. $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -es koncentrációnál teljes mértékű depolimerizáció következett be, csupán a sejtmag körül lokalizálódott pár filamentum.

A hazai törzsek közül az ACT 9502 $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -es koncentrációban akadályozta a sejtek felülethez való kitapadását, ami erőteljes filopodiumképzésben valamint a sejtek lekerekedésében nyilvánult meg. $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -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 $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -os koncentrációnál.

A *C. raciborskii* ACT 9504 törzse bizonyult az aktinszerkezeten kiváltott változások tekintetében a leghatásosabbnak. Már $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ koncentrációjú kivonat kiváltotta az aktin filamentumok depolimerizálódását, a stressz rostok lebontását, mely a sejtek lekerekedésében nyilvánult meg.

Végezetül az ACT 9505 *C. raciborskii*-ből készült kivonat szintén az aktin filamentumok depolimerizációját indukálta $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -es koncentrációnál, ami meglepetésnek bizonyult, hiszen a kromatin állomány kondenzálódását ez a kivonat nem befolyásolta.

Eredményeink hűen tükrözik a *C. raciborskii* változékonyságát, sokféleségét. Ismeretes, hogy ezen cianobaktérium fajnak vannak olyan izolátumai melyek képesek cilindropermopszin 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.

3.3. Cianotoxinok és cianobaktérium kivonatok hatása a CHO-K1 sejtek mikrotubuláris rendszerére

3.3.1. CHO-K1 sejtek mikrotubuláris rendszerének változásai a tisztított cianotoxinokkal való kezelés hatására

A cilindropermopszin hatásának vizsgálata során a hörcsög sejtek mikrotubuláris szerkezete jelentősen megváltozott 24 órás expozíciós időt és $2 \mu\text{M}$ -os koncentrációt használva. A cilindropermopszin koncentráció emelése a tubulincsővecskék depolimerizációját jelentősen növelte, $10 \mu\text{M}$ -os tartományban már csak a nukleusz körül figyelhattunk meg némi tubulin jelenlétére utaló jelet. 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 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 másik vizsgált cianotoxin, a mikrocisztin-LR esetén 10 μM -os koncentrációnál figyelhettünk meg elsőként szerkezetbeli változásokat a 24 órás expozíciós idő alatt: a tubulosok hossza csökkent, a sejtek kevésbé kiterültek, mint a kontroll populációbeliak. 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 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).

3.3.2. CHO-K1 sejtek mikrotubuláris rendszerének változásai a cianobaktérium kivonatok hatására

A bizonyítottan CYN-t termelő AQS törzs már 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -es koncentrációjú kivonattal való kezelés esetén beindította a mikrotubulusok depolimerizálódását, magasabb koncentrációnál pedig már egészen a centriólumok közelébe lokalizálódtak a tubulusok, illetve a tubulusokat felépítő dimerek.

ACT 9502-es törzset vizsgálva 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -es koncentrációnál a tubulusok rövidülését figyelhettük meg, míg a 2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ kivonatot tartalmazó minta esetén szignifikánsan megnőtt a „bab” illetve „súlyzó” alakú sejtmaggal rendelkező sejtek száma, illetve további depolimerizáció volt megfigyelhető. Vagyis a sejtek a citokinézis kezdeti fázisában megálltak.

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 időfüggő módon a mikrotubulusok szétszerelődését, illetve a sejtek aggregációját váltotta ki. Csökkent a sejtenkénti mikrotubulusok száma, 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 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -es koncentrációnál megfigyelhető volt a 24 órás kezelési idő után. 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.

3.4. Cianotoxinok és cianobaktérium kivonatok hatása a CHO-K1 sejtek laktát-dehidrogenáz enzimének aktivitására

3.3.1. A tisztított cianotoxinok hatása a CHO-K1 sejtek LDH enzimének aktivitására

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 kezelési idő mellett csökkent. Probit analízissel meghatároztuk a cilindrospermopszin CHO-K1 sejteken mutatott EC_{50} értékét, ami $0.00108893 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -nek bizonyult. Hepatocitáknál 18 órás $1 \text{ }\mu\text{M}$ CYN-nal és e feletti koncentrációkkal történő kezelések 75%-os LDH felszabadulást váltottak ki (Humpage és mtsai., 2005).

Mikrocisztin-LR-rel kezelve a sejteket 3 órás expozíció esetén a sejtekből felszabaduló LDH aktivitás végig a kontroll érték körül maradt, nem változott a koncentráció függvényében. 24 óra után, MC-LR hatására az LDH aktivitás a koncentráció függvényében szignifikánsan nőtt ($p < 0,005$). A $20 \text{ }\mu\text{M}$ -os mikrocisztin-LR oldat a maximálisan felszabadítható LDH-nak körülbelül 60%-át szabadítja fel. A CHO-K1 sejt kultúránk esetében a LDH enzimaktivitási adatokból Probit analízissel számolt EC_{50} érték $0.013803843 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Botha és mtsai. (2004) CaCo2 és MCF-7 sejteken hasonló eredményeket kaptak: $50 \text{ }\mu\text{M}$ MC-LR hatására már 30 perc után megfigyelték az LDH aktivitás növekedését, mely a MC-LR-rel való kezelés következtében felszabaduló reaktív oxigén gyökök hatásának eredményeként tudható be.

3.4.2. A cianobaktérium kivonatok hatására a CHO-K1 sejtek LDH enzimaktivitására

A bizonyítottan toxikus AQS törzs extraktuma 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 9502, ACT 9505 és legkisebb mértékben az ACT 9503. Probit analízissel meghatározva az EC_{50} értékeiket a következő értékeket kaptuk: ACT 9502: $0.71 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, ACT 9503: $1.65 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, ACT 9504: $0.45 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, ACT 9505: $1,54 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Mindegyik cianobaktérium kivonat EC_{50} értéke nagyságrendekkel nagyobbak bizonyult, mint a tisztított toxinoké.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

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 alapján (kromatinkondenzáció, mikrofilamentáris és mikrotubuláris rendszeren kifejtett hatás, illetve a sejtmembrán integritásának vizsgálata LDH enzimaktivitás változásának mérésével) az egyes törzsek eltérő hatásokat mutattak. Mindegyik tesztben toxikusnak bizonyult a 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 szinergisztikus 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.

Comparative study of the effects of cyanotoxins and cyanobacterial extracts in CHO-K1 cells

PhD thesis

Gácsi Mariann

1. INTRODUCTION

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 remarkable deteriorations in different fields of the aquatic environment: water consumption, drinking water treatment, agriculture, fishing. It pays attention to the monitoring the phytoplankton and cyanobacterial occurrence, abundance and distribution. Lake Balaton is not only used for recreational purposes but it is also an important drinking water resource. The proliferation of *C. raciborskii* in Lake Balaton has been documented in late 1970s and early 80s and caused danger for water supplies (Oláh *et al.*, 1981, Vörös *et al.*, 1983).

Ecotoxicological tests have been performed to monitor whether an algal bloom contains toxin producing cyanobacteria or not and to determine how toxic are their metabolites. Cyanotoxins may have an impact not only on phyto- and zooplanktons but also on higher plants (Beyer *et al.*, 2009; Máthé *et al.*, 2009). After death and lysis of cyanobacterial cells cyanotoxins appear in waters and can cause health problems at water consuming wild or domestic animals or in else when toxins appear in the drinking water system on human health as well (Chorus and Bartam, 1999). Cyanotoxins can cause diseases such as gastroenteritis, hepatomegaly, kidney and spleen diseases, liver cancer, skin irritation or allergic reactions.

The first report was written about mass cyanobacterium appearance in Lake Balaton in 1934 (Sebestyen *et al.*, 1934). In Lake Balaton from 1970s had been regular summer algae-blooms by N₂ fixing and caused water discolouring primarily in the western and later in the eastern part of the lake (Gorzó and Kiss, 1985; Padisák *et al.*, 1984; Vörös *et al.*, 1983). In 1994, a mass development of cyanobacteria occurred in Lake Balaton, the bloom was due to the growth of an almost pure culture of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Présing *et al.*, 1996).

The appearance of cyanobacterial-blooming makes worth to study and to monitor the toxicity of cyanobacterium strains responsible for mass production in Lake Balaton (Hiripi *et al.*, 1998; Kiss *et al.*, 2002).

Cyanotoxins can be hepatotoxic (CYN, MC-RL), neurosystem functions affecting (anatoxins, saxitoxins) and skin irritant metabolites.

Hiripi *et al.* (1998) detected toxic effects of the massculture of *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena aphanizomenoides*, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) and *Microcystis aeruginosa* extracts on fish and on locust species (*Locusta migratoria migratorioides*). The chemical analysis of their toxic metabolites has not been done yet. Kiss *et al.* (2002) examined with electrophysiological methods the effects of different fractions

from *C. raciborskii* extract on the central nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis* under isolated conditions and determined several components with different effects. Some of them had shown similar neurotoxic effects as anatoxin-a (Swanson *et al.*, 1986).

The aim of our study was to monitor the toxic effects of different cyanotoxins (cylindrospermopsin (CYN) and microcystin-LR (MC-LR)) and extracts of cyanobacterium 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).

It is known that cyanobacterial toxins alter cytoskeletal structures, induce membrane permeability changes, modify different enzyme activities, alter protein synthesis and may have genotoxic and carcinogenic effects.

The aims of the study were the followings:

- What are the alterations in chromosome development, what kind of morphological changes can be seen during chromatin condensation in exposed cell cultures compared to control ones?
- What kind of changes are induced on the microfilamentar and microtubular system by cyanotoxins and cyanobacterial extracts?
- How do the cyanotoxins and cyanobacterial extracts influence the LDH leakage of cells?
- Is there any correlation between the different aspects of changes induced either by cyanotoxins or by cyanobacterial extracts?

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell culture

The Chinese hamster ovary cells (CHO-K1, ATCC #CCL61) were grown at 37 °C in 5% CO₂ containing atmosphere in Jouan IG 150 water jacket CO₂ incubator (Jouan, Paris, France) in F-12/Ham's medium supplemented with 5% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) and 100100 U/ml penicillin/streptomycin (P4458, Sigma).

Cells for the chromatin condensation analysis were grown in TC flasks (Greiner), for investigation of the cytoskeleton they were grown in 4 well plates on coverslips and for LDH measuring in 96 well plates. Cells were transferred to each flask/well and allowed to grow for 1 day before treatment.

2.2. Preparing of cyanotoxins and cyanobacterial extracts

The purified toxins were a gift from Prof. György Borbély's workgroup. Cylindrospermopsin was purified from *Aphanizomene ovalisporum* (Forti) strain ILC-164, isolated in 1994 Lake Kinneret, Israel (Banker *et al.*, 1997). The purification was performed as perviously described (Vasas *et al.*, 2002; 2004). MC-LR was purified from *Microcystis*

aeruginosa BGSD 243 isolated from Lake Velencei, Hungary, in 1991. The purification was performed according to Kós *et al.* (1995).

We cultured our cyanobacterial strains: *C. raciborskii* (AQS), *C. raciborskii* ACT 9502, *C. raciborskii* ACT 9503, *C. raciborskii* ACT 9504, *C. raciborskii* ACT 9505 in NaNO₃ free BG-11 medium. Our cultures were grown at 22±1 °C, having 14:10 h light :dark photoperiods under 80 µmol m⁻² s⁻¹ light intensity (US-SQS/L spherical microsensor, WALZ), supplied with cool white fluorescent lamps (Tungsram F-33, 40 W). Exponentially growing cyanobacterial cells were harvested by centrifugation, filtered with Whatman GF/C filter, freeze dried, kept on -20°C, until homogenisation by an ultrasound sonicator (Cole-Palmer 4710 series).

2.3. Treatments with cyanotoxins and cyanobacterial extracts

We tested cyanotoxins (CYN and MC-LR) and 5 cyanobacterium strains, namely: *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9502, *C. raciborskii* ACT 9503, *C. raciborskii* ACT 9504, *C. raciborskii* ACT 9505) and a CYN producing *Cylindrospermopsis raciborskii* (AQS) strain (Valério *et al.*, 2005).

Toxins and extracts were diluted in serum free F-12/Ham medium to final concentration. At the beginning of treatment we changed the medium for serum free medium on the control cells as well.

The tested concentrations were the following: in the case of CYN 0,5-5 µM, in the case of MC-LR 5-50 µM and the case of extracts 0,02-5 mg·ml⁻¹. Cells were treated with either toxins (CYN and MC-LR) or extracts for 24h when chromatin condensation was investigated. Cells were incubated in the case of cytoskeletal experiments for 24 h, sometimes 48 or 72 h and for LDH measurements for 3 and 24 hours.

2.4. Synchronization and analysis of cell cycle by FACS

Synchronization was performed by counterflow centrifugal elutriation (Offer *et al.*, 2001) Cells were harvested by centrifugation at 600xg for 5 min and resuspended in F-12/Ham medium containing 1% FBS at 10⁷ cells/ml. Before using the system it was sterilised with 70% ethanol. Cells (10⁷) were introduced into the elutriator rotor (Beckman J-6 MI) equipped with a JE-5.0 elutriation system including a Sander chamber and a MasterFlex peristaltic pump. Elutriation was performed at of 20 °C temperature. Eight fractions (100 ml each) were collected at increasing flow rates (+ 6 ml/min). The initial flow rate was 13ml/min.

Each fraction was analyzed by FACS. Cells were fixed with 70 % methanol at room temperature and stained with 50 µg·ml⁻¹ proidium-iodide. The nuclear DNA content, expressed in C-values (1C value corresponds to the haploid DNA content per cell), cell number, size and volume were monitored with a Cell Quest software (Beckton-Dickinson).

2.5. Cell nuclei preparation and analysis of chromatin

We used reversal permeabilisation for both control and treated cells (Gácsi *et al.*, 2009). After reversal permeabilisation cells were resuspended in growth medium and incubated with 0,1 μgml^{-1} colcemid for 2 hours at 37°C. Cells were detached with trypsin and washed with PBS then centrifugated at 500 x g for 5 min and incubated at 37 °C for 10 minutes in swelling buffer. Swelling buffer was then removed by centrifugation at 500 x g for 5 min. 20 ml of fixative (methanol: glacial acid; 3:1) was added to the nuclei. Nuclei were centrifugated at 500 x g for 5 min, washed twice in fixative and resuspended in 1 ml fixative.

Nuclei were spread over glass slides dropwise from a height of approximately 30 cm. Slides were air dried, stored at room temperature overnight, rinsed with PBS and dehydrated using increasing concentrations of ethanol. Dehydrated slides were mounted with DAPI-ANTIFADE medium under 24x50 mm coverslips. Chromatin structures were monitored under Nikon Optiphot epifluorescent microscope. At least 30 fields were photographed with Spot software.

2.6. Determination of cytoskeletal changes by immunocytochemistry

For the detection of the toxin and extracts effect on the cytoskeleton, the fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled phalloidin was used for staining the F-actin, whereas the cy3-conjugated monoclonal anti- β -tubulin antibody was applied to stain tubulin.

After treatments, the medium was removed and the cover slips were washed gently once with PBS. Cells were then fixed either with 1 ml 4% freshly prepared paraformaldehyde in PBS for 5 min at room temperature in the case of actin labelling, or at -20 °C with methanol for 10 min, then at -20 °C with acetone for 10 sec for tubulin labelling. After subsequent washing twice with PBS, the incubation of samples with the FITC-conjugated phalloidin (1:5000 in PBS) lasted for 3 h or with cy3-anti- β -tubulin antibody (1:200) for 3 h in the dark at room temperature. Samples were washed twice with PBS and once with distilled water to remove PBS, and then counterstained with DAPI (for nuclear staining). Specimens were viewed under Nikon Optiphot epifluorescence microscope. At least 30 fields were photographed with Spot RT software.

2.7. Lactate dehydrogenase (LDH) assay

After treatments 40 μl supernatant was removed and added to 250 μl NADH (0.3 mM NADH (Sigma - Aldrich), dissolved in 0.1 M Tris-NaCl buffer (pH 7.2) and 40 μl pyruvic acid (20 mM pyruvic acid (Sigma - Aldrich), dissolved in 0.1 M Tris-NaCl buffer (pH 7.2). We measured changes in absorbance at 340 nm. LDH activity was calculated from the change in absorbance and correction was made by subtracting the background absorbance measured for cyanobacterial extracts. The enzyme activities were calculated on the basis of protein content.

Protein content was determined with Bradford reagent (B6916). After treatments the supernatants were removed and plates were washed once with Tris-NaCl buffer (pH 7.2). Then, after the addition of 1 % TritonX-100 containing Tris-NaCl (pH 7.2) buffer, plates were kept at -20 °C overnight for cell lysis. Next day samples were thawed, centrifuged (centrifuge: Biofuge *fresco*, Hereus #3325) at 10000 rpm on 4°C for 8 minutes. To quantify protein content we added 10 µl supernatant to 70 µl Tris-NaCl (pH 7.2) and 60 µl Bradford reagent. After incubation at room temperature for 10 minutes the absorbance of samples was measured at 595 nm.

2.8. Statistical analysis

The average and standard deviation of results were plotted with the aid of Origin7 software. The comparison of changes in LDH activity of treated cells lysates relative to control ones revealed significant differences by using linear regression provided by the aid of Origin7 program.

We applied probit analysis to the obtained LDH activities to determine EC₅₀ values (half maximal effects concentration, which produces 50% of the maximum possible response for the examined material) cells go through apoptosis/ necrosis for the five investigated strains and cyanotoxins, as described by Hubert (1980). Our experiments were repeated three times.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Morphological changes of chromatin condensation in control and treated CHO-K1 cells

3.1.1. Chromatin condensation of synchronized control CHO-K1 cells

Synchronized cell populations of control CHO-K1 cells were obtained by counter flow centrifugal elutriation (Offer *et al.*, 2001). These populations were examined with fluorescent microscopy and subjected by FACS analysis. 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 DNA was highly decondensed and appeared as a fuzzy, veil like chromatin structure. Later in the early S phase chromatin began to turn into supercoiled, ribboned structures. In the mid-S phase the supercoiled chromatin turned into chromatin fibers. These fibers folded into elongated prechromosomes in the later S and G2 phases and during mitosis into metaphase chromosomes. These different condensation forms could be clearly distinguished and visualized in control CHO-K1 cells. Bánfalvi *et al.* (2006) examined chromatin condensation in different cell lines such as K-562 - human leucocyte, IM – indian muntjac fibroblast cells and have seen similar chromatin structures as we have observed in CHO-K1 cells.

3.1.2. Chromatin condensation changes during treatment with purified cyanotoxins or with cyanobacterial extracts

Concentrations of cylindrospermopsin equal to and higher than 1 μM had significant effects on chromatin condensation. CYN treatment generated hole-like structures in the chromatin of middle S phase cells. 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 forms when the cells were treated with 2 μM CYN. Shaw *et al.* (2000) described the covalent binding of CYN and its metabolites to the DNA. Beyer *et al.* (2009) have shown in reed root cells that CYN induces and increases the number of cells being in early mitosis, and a decreased percentage of metaphase cells. CYN is known to inhibit eukaryotic protein synthesis so it can inhibit either the production of those proteins which are necessary for entering mitosis, or regulatory proteins of the next subphase in mitosis.

When CHO-K1 cells were treated with lower (2-10 μM) 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 μM or higher concentrations: the cell-cycle was blocked in late interphase and early phase of the mitosis. This was manifested as abnormal forms: broken elongated prechromosomes, hypercondensed chromosomes and apoptotic bodies. The effect of the MC-LR on cell division can be explained by its inhibitory effects on PP1 and PP2A which play key role during the cell cycle (Ayaydin *et al.*, 2000; Brautigan, 1994; Smith and Walker, 1996). PP2A regulates the sister chromatin formation and exit from mitosis (Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006) and it also has a regulatory effect on MAPK (Tamura *et al.*, 2002).

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 observe chromosomes similarly to the treatment of CYN.

Extract of the ACT 9502 strain did not cause noticeable 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 did not induce any changes during the chromatin condensation. We could see all typical structures of every cell cycle 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 modified structures were observed such as polarized chromatin vesicles detached from the main chromatin. In the synthetic phase entirely disrupted chromatin structures dominated the picture, the continuity of the chromatin was disrupted without appreciable folding and supercoiling. Only a few metaphase chromosomes were seen.

Neither the ACT 9505 isolate nor the ACT 9503 caused changes in chromatin condensation. Experiments are in progress to identify the toxic compounds of these strains (Vehovszky *et al.*, 2009; Farkas *et al.* 2009 unpublished data, Antal *et al.*, 2009 unpublished data).

3.2. Changes of the microfilamentary system in CHO-K1 cells

3.2.1. Microfilamentary changes induced by purified cyanotoxin

CYN caused a time- and concentration- dependent depolymerisation of microfilaments in CHO-K1 cells. 24 hours exposure to 1 μM or higher toxin concentration induced actin depolymerisation. There are only a few data available regarding the effect of CYN on the microfilamentary system. Fessard and Bernard (2003) found that cells treated with CYN (0.5 and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) tended to round up, and their cytoskeleton was altered, with disorganized cortical actin and formation of blebbing (apoptotic) cell.

MC-LR treatments for 24 hours at lower than 20 μM concentration did not induce changes in the microfilamentary system. At 20 μM concentration we noticed strong filopodium formation and at 50 μM MC-LR concentration the shape of the cells rounded up and all stress fibers were depolymerised. We found that the effect of toxins effects was dependent on time and concentration. Longer exposure for 48 and 72 hours evoked similar toxic effects at low (5 μM) MC-LR concentration. The effects of MC-LR on rodent hepatocytes cytoskeleton is known (Billam *et al.*, 2008; Eriksson *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 1995) and had also been detected in fish (Li *et al.*, 2001). The disruption of the microfilamentary system was due to the inhibition of protein phosphatases (MacKintosh *et al.*, 1990; Runnegar *et al.*, 1999), and to oxidative stress (Ding *et al.*, 2000)

3.2.2. Microfilamentary changes induced by *C. raciborskii* extracts

After 24 hours treatment with 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ AQS extracts caused the cells to round 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 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ extract causing the microfilaments to collapse near the nucleus.

Treatment for 24 hours with 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ extract of ACT 9502 strain inhibited the attachment of the cells to the surface, caused rounded cell shape. After treatment with 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, actin was present only around the nuclei, losing 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 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ extract concentration.

Among the *C. raciborskii* strains isolated from Lake Balaton the ACT 9504 strain was the most toxic for the microfilament system of our cell cultures. 1 mg·ml⁻¹ extract caused actin depolymerisation, stress fibers depolymerisation and cell rounding.

The ACT 9505 extract also caused the actin depolymerisation of actin at 2 mg·ml⁻¹ too. This came as a surprise as this strain did not induce changes in the chromatin condensation.

Our results reflect the diversity of *C. raciborskii*. Some of these strains produce CYN (Griffiths and Saker, 2003), others PSP toxins (Lagos et al., 1999), while some of the toxic compounds have not been identified, yet.

3.3. Alteration in the microtubular system of CHO-K1 cells

3.3.1. Microtubular changes induced by purified cyanotoxins

CYN had a strong effect on hamster cell's microtubular system. Its depolymerisation was observed at 2 µM and 24 hours treatment: 10 µM caused a faster depolymerisation in the cytoplasm and had somewhat weaker effect near the nucleus. Beyer *et al.* (2009) found that CYN induced the formation of tripolar spindles, with incomplete sister chromatid separation during anaphase. The inhibition of protein synthesis may cause the rearrangement of microtubules to a less energy consuming (e.g. longitudinal) orientation (Baluska *et al.*, 1995). The observation of Beyer *et al.* (2009) suggest that exposure to MC-LR increases the β-tubulin content that may reach exceptionally high concentrations, instead of inhibiting tubulin polymerization. CYN seems to induce the inhibition of microtubular assembly and/or stabilization.

In the case of MC-LR we found changes in the microtubular system starting at 10 µM treatment and 24 hour exposure: such as decreased length of microtubules and detachment of cells from the surface. 20 µM caused the microtubule depolymerise and its dimer localisation near the nucleus. Treatment with 50 µM MC-LR caused not only the depolymerisation of microtubules but also chromatin damages. It is known that MCLR caused the hyperphosphorylation of cytoskeletal and cytosolic proteins (Eriksson et al., 1989) The hyperphosphorylation of microtubule associated protein influences the polymerization ability of microtubules (Brugg and Matus, 1991).

3.3.1. Microtubular changes induced by cyanobacterial extracts

Extract of CYN producing AQS strain initiated the 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.

The extract of ACT 9502 blocked the cell cycle in the early stages of cytokinesis. We observed the shortening of microtubules when the cells were exposed to 1 mg·ml⁻¹ extract and

further shortening could be seen upon treatment with 2 mg·ml⁻¹ with somewhat increased cells number with dumbbell like nucleus.

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

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

Significant morphological changes were induced by the extract of ACT 9505 strain. Depolymerisation of the tubuli were seen after 24 hour exposure with 1 mg·ml⁻¹ extract.

During toxicosis the stress protein can associate to microtubules altering their polymerization. Quantitation of extracted proteins generated during toxicosis, causing microtubular damages, is worths to be examined in future experiments.

3.4. Changes in the lactate dehydrogenase (LDH) activity of CHO-K1 cells

3.4.1. Changes in the LDH activity in CHO-K1 cells treated with cyanotoxins

The effect of CYN on the leakage of LDH was dose dependent both after 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 determined the EC₅₀ value of CYN on CHO-K1 cells which was 0.00108893 mg·ml⁻¹. The toxicity of hepatocytes against 1 µM or higher concentrations of CYN after 18 hours exposure resulted in 75% LDH leakage (Humpage *et al.*, 2005).

CHO-K1 cells treated with MC-LR for 3 hours did not show changes in the LDH activity and corresponded to the control value. 24 h exposure the toxin induced significant increases in LDH activity. We calculated the EC₅₀ value using Probit analysis which turned out to be 0.013803843 mg·ml⁻¹. Botha *et al.* (2004) found that when CaCo2 and MCF-7 cells were exposed to 50 µM MC-LR it resulted in an increased LDH activity after 30 minutes incubation. This could be the effect of reactive oxygen species induced by MC-LR.

3.4.2. Changes in the LDH activity in CHO-K1 cells treated with *C. raciborskii* extracts

The AQS strain extract caused a significant increase in 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 EC₅₀ values were as follows: 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. The EC₅₀ values of all cyanobacterial extract were by an order of magnitude higher, than the purified toxins.

4. SUMMARY

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..

IRODALOM/REFERENCES

- 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.
- 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, Röszer T, Basnakian AG (2006) Common pathway of chromosome condensation in mammalian cells. *DNA Cell Biol* 25:295-301.
- 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.

- Beyer D, Surányi G, Vasas G, Roszik J, Erdődi F, M MH, Bácsi I, Bátor R, Serfőző Z, Szigeti ZM, Vereb 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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, 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.
- 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.
- 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.
- Gácsi M, Antal O, Vasas G, Máthé C, 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.
- 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.
- 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.

- Humpage AR, Fontaine F, Froschio 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.
- Hubert J (1980) Bioassay, Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, Iowa
- Ito E, Kondo F, Harada K (1997) Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon* 35:231-239.
- 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.
- 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.
- 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.
- Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Mahakant 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.
- 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.
- Offer H, Zurer I, Bánfalvi G, Rehák M, Falcivitz A, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V (2001) p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res* 61:88-96.
- Oláh J, ElSamra MI, Abdel-Moneim MA, Tóth L, Vörös L (1981) Nitrogénkötés halhústermelő ökoszisztémákban [Nitrogen fixation in fish-producing agroecosystems]. *A halhústermelés fejlesztése* 10, HAKI, Szarvas
- 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
- Présing M., Herodek S, Vörös L, Kóbor I (1996) Nitrogen fixation, ammonium and nitrate uptake during a bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Balaton. *Arch Hydrobiol* 136: 553–562
- Runnegar MT, Wei X, Hamm-Alvarez SF (1999) Increased protein phosphorylation of cytoplasmic dynein results in impaired motor function. *Biochem J* 342:1-6.
- Sebestyén O (1934) "Vízvirágzás" a Balatonon? *M Biol Int Munk* 7:205-208

- Shaw GR, Seawright AA, Moore MR, Lam PK (2000) Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. *Ther Drug Monit* 22:89-92.
- Smith RD, Walker JC (1996) Plant Protein Phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:101-125.
- 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.
- 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.
- Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI (2006) Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opinion in Cell Biol* 18:623-631.
- Valério E, Pereira P, Saker ML, Franca S, Tenreiro R (2005) Molecular characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portugal freshwaters. *Harmful algae* 4:1044-1052.
- 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.
- Vasas G, Gáspár A, Páger 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.
- 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, Vizkelety E, Toth F, Németh J (1983) Trofitás vizsgálatok a Balaton Keszthelyi medencéjében. *Hidr Közl* 62:390–395.

A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGÉNEK JEGYZÉKE

Az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott 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. 6sz. 28-30)

Bánfalvi G, Nagy G, **Gácsi M**, Röszer T, Basnakian AG. (2006): Common pathway of chromosome condensation in Mammalian cells, *DNA Cell Biol* 25:295-301 IF.: 1,905.

Gácsi M., Nagy G., Pintér G., Bánfalvi 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

Egyéb megjelent, vagy közlésre elfogadott 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

Kovács W. A., Felföldi T., Saker L. M., **Gácsi M.** (2007): *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) cilindrospermopszin termelő képességének molekuláris vizsgálata *Hidr Közl*, 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

Gácsi M., Czégény I., Nagy G., Bánfalvi G. (2005): Survival of fish upon removal of cyanide from water. Environ Res 97:293-99. IF.: 1,79

Nagy G., **Gácsi M.**, Rehak M., Jenei Z., Röszer T., Klaisz M., Bánfalvi G. (2004): Gamma irradiation-induced changes in the state of the interphase chromatin in nuclei of murine-pre-B cells. Apoptosis 9:765-76. IF.: 4,54

Gácsi M., Bánfalvi G. (2001) Cyanide detoxification based on the survival of fishes. Acta Biol Debrecina 23, 68-70

Az értekezés témakörében elhangzott előadások és 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 Társaságának 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 sejtvázszerkezetére, *XLIX. Hidrobiológus Napok*, Tihany, 2007. október 6-8. Tudományos konferencia előadás, poszter

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.

Kovács A., Felföldi T., Saker L. M. and **Gácsi M.**: Molecular investigation of the toxicity of *Cylindrospermopsis Raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in Lake Balaton (Hungary) using isolated strains and field samples, Reslim 2006, Brno, 2006. augusztus 27- szeptember 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) cylindrospermopsin termelő képességének molekuláris vizsgálata XLVIII. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2006. október 4-6.

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.

Egyéb előadások és poszterek

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.

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 élettan alapjai” című tehetséggondozó tanfolyam (2002-2005) előadás, gyakorlat

Antal Otilia Tamara diploma és TDK munkájának témavezetője