Szerkezetmeghatározási módszerek alkalmazása cianobakteriális toxinok és szintetizált biológiailag aktív vegyületek körében

Doktori (PhD) értekezés

Fejesné Tóth Eszter

Témavezető: Dr. Borbély György egyetemi tanár



Készült: A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Doktori Iskolájának keretében A Debreceni Egyetem Növénytani Tanszékén

Debrecen, 2007

Rövidítésjegyzék:

cpcBA-IGS	a fikocianin alfa és béta alegységei közti, génen belüli elválasztó			
	(intergenic spacer beetween the alfa and beta subunits of phycocyanin)			
CE	kapillárelektroforézis (Capillary Electrophoresis)			
CYN	cilindrospermopszin (cylindrospermopsin)			
DHB	2,5-dihidroxi-benzoesav (2,5-dihydroxybenzoic acid)			
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (4-(2-HydroxyEthyl)-1-			
	Pyperazine EthaneSulfonic acid)			
HPLC	nagynyomású folyadékkromatográfia (High Pressure Liquid			
	Chromatography)			
IC ₅₀	50 %-os gátlást okozó koncentráció (concentration required for 50 %			
	inhibition)			
IR	infravörös (infrared)			
MEK	micelláris elektrokinetikus kromatográfia (Micellar Electrokinetic			
	Chromatography)			
MS	tömegspektrometria (Mass Spectrometry)			
nifH	a dinitrogenáz reduktázt kódoló gén			
NRPS	nem riboszomális peptid szintáz (Non-Ribosomal Peptide Synthetases)			
rRNS	riboszómális RNS (ribosomal RNA)			
rpoC1	RNS polimeráz C1 alegység (RNA polymerase C1 subunit)			
PKS	poliketid szintáz (polyketide synthase)			
PP1A	proteinfoszfatáz 1A (Protein Phosphatase 1A)			
PP2A	proteinfoszfatáz 2A (Protein Phosphatase 2A)			
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulphate)			
SIM	egyedi iondetektálás (Selected Ion Monitoring)			
SRM	egyedi reakciódetektálás (Selected Reaction Monitoring)			
Tris	trisz(hidroximetil)aminometán (tris(hydroxymethyl)aminomethane)			
UV	ultraibolya (ultraviolet)			
VRK	vékonyrétegkromatográfia			

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK	5
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1.	A cianobaktériumok általános jellemzése	7
2.2.	A vízvirágzások és a toxikus cianobaktériumok	8
2.3.	A cianobaktériumok által termelt toxikus metabolitok (cianotoxinok) általános	
	jellemzése	10
2.4.	A cianobaktériumok által termelt toxikus metabolitok (cianotoxinok) laboratórium	i
	vizsgálata	12
2.5.	A Cylindrospermopsis raciborskii nitrogénkötő, fonalas cianobaktérium részletes	
	bemutatása	14
2.6.	A cilindrospermopszin részletes ismertetése	16
2.7.	A Microcystis aeruginosa és a mikrocisztin	18
2.8.	A környezetei tényezők hatása a cianobaktériumokra	18
2.9.	A pterokarpánok	19
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
3.1.	Anyagok és eszközök	21
3.2.	A munka során vizsgált cianobaktérium törzsek és azonosításuk	21
3.3.	A planktonikus cianobaktériumok izolálása és nevelése laboratóriumi körülménye	2
	között	21
3.4.	A fehérmustár-növényteszt (Blue-Green Sinapis Test)	22
3.5.	A Cylindrospermopsis raciborskii növekedési görbéjének meghatározása	23
3.6.	A spektrofotometrálás körülményei	23
3.7.	A klorofill-a tartalom meghatározása	24
3.8.	Az A ₈₀₀ értékének meghatározása	24
3.9.	A fehérjetartalom meghatározása	24
3.10	. A szárazanyagtartalom meghatározása	24
3.11	. A toxicitás meghatározása mustárnövény teszttel	24
3.12	. A cianotoxintartalom változásának vékonyrétegen történő nyomonkövetése	25
3.13	. A C. raciborskii sejtek előkészítése a toxikus metabolitok izolálására	25
3.14	. A toxikus anyagcseretermékek izolálásához használt kromatográfiás eljárások	25
3	.14.1. Az anioncserélő oszlop (DEAE-52, Whatman) elkészítése	26

3.14	4.2. A Toyopearl HW-40 oszlop előkészítése	. 26
3.14	4.3. A szilikagéloszlop elkészítése	. 26
3.14	4.4. A HPLC tisztítási módszerek	. 26
3.15.	A kromatográfiás frakciók toxicitásának meghatározása	. 27
3.16.	A vékonyrétegkromatográfia	. 27
3.17.	Az NMR analízis	. 27
3.18.	A tömegspektrometriai mérések	. 28
3.19.	Az IR spektrumok	. 29
3.20.	A cianobakteriális nyers kivonattal történő kezelés hatásának vizsgálata mustár	
	csíranövényeken	. 29
3.21.	A mustárnövények cianotoxinnal történő kezelése és a kezelés hatásának vizsgálata	30
3.22.	A fehérjemintázat vizsgálata gélelektroforézissel	. 30
3.23.	Az ssDN-áz aktivitás vizsgálata gélelektroforézissel	. 31
3.24.	A proteázaktivitás vizsgálata gélelektroforézissel, cianotoxinokkal kezelt	
	mustárnövényekből	. 32
3.25.	A környezeti hatások vizsgálata	. 33
3.26.	A cianotoxinok izolálás a terepi mintákból	. 33
3.27.	A pterokarpán és deuterált származékainak szintézise	. 34
4. E	REDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	. 37
4.1.	A C. raciborskii (BGSD 266) cianobaktérium laboratóriumi körülmények közötti	
	nevelése	. 37
4.2.	A cianotoxinok izolációja	. 40
4.3.	A tisztított, cianobakteriális ismeretlen metabolit szerkezetazonosítása	. 45
4.4.	A nominális molekulatömeg meghatározása	. 45
4.5.	A pontos tömeg és az összegképlet meghatározása	. 47
4.6.	Az NMR módszerekkel kapott eredmények és értékelésük	. 48
4.6.	1. Egydimenziós NMR-spektrumok (¹ H, ¹³ C) spektrumok kiértékelése	. 48
4.6.	2. A kétdimenziós NMR-spektrumok kiértékelése	. 49
	4.6.2.1. A HSQC-spektrumok kiértékelése	. 49
	4.6.2.2. A TOCSY spektrumok kiértékelése	. 51
	4.6.2.3. A HMBC-spektrumok kiértékelése	. 53
	4.6.2.4. A NOESY-spektrumok kiértékelése	. 57
4.6.	3. A cserélhető hidrogének számának meghatározása (hidrogén-deutérium csere).	. 60
4.6.	.4. Az NMR és MS mérésekből következő részeredmények	. 62

4.	.6.5. A molekula aglikonrészének szerkezetfelderítése	63
4.7.	Az infravörös spektrum értelmezése	65
4.8.	Az MS-MS spektrumokból levont következtetések	66
4.9.	Az UV-spektrum értelmezése	69
4.10	. A cianotoxin szerkezetének felírása	69
4.11	. Az aglikonra vonatkozó NMR adatok értelmezése	70
4.	.11.1. A HMBC spektrum értelmezése	70
4.	.11.2. A NOESY spektrum értelmezése	72
4.12	. A fragmentációs útvonalak	72
4.13	. Az izolált metabolit (CYC) biológiai hatásainak előzetes analízise	82
4.14	. A tisztított cilindrospermopsziciklinnel kezelt mustárnövények növekedése	85
4.15	. A fehérjemintázat változása a C. raciborskiival kezelt növényekben	86
4.16	. Enzimvizsgálatok a C. raciborskii nyers kivonatával és a szervezetből izolált	
	cilindrospermopsziciklinnel kezelt mustárnövényekkel	88
4.	.16.1. A proteázok gélelektroforézise	88
4.	.16.2. Az izolált cianotoxin (CYC) hatása a mustárnövény-nukleázok aktivitására	90
4.17	. A tápeleméheztetés hatása a C. raciborskii cianobaktérium növekedésére és	
	toxintermelésére	91
4.18	. A Kis-Balatonból izolált cianobakériumok mikrocisztintartalmának meghatározása	. 96
4.19	. A pterokarpán váz jellegzetes fragmentációs útvonalai	97
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	106
6.	SUMMARY	107
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108
8.	A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE	109
9.	IRODALOMJEGYZÉK	112

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A természetben előforduló biológiailag aktív anyagok azonosítása és koncentrációjuk minél pontosabban történő meghatározása a környezeti analitika egyik fontos feladata. A szerkezeti meghatározásra számos lehetőség nyílik, mint például az NMR-spektroszkópia és a tömegspektrometria. A tömegspektrometria előnye, hogy nagyon kis mintamennyiség (pg/ml) is elegendő az analízishez, ezért egyre elterjedtebben alkalmazzák a felszíni vizekben jelenlévő toxikus anyagok vizsgálatánál, illetve a növényekben található kismennyiségű kimutatására. А toxikus vízvirágzások esetén, – amely hatóanyagok fontos környezetanalitikai probléma – a tömegspektrometriának kiemelt jelenősége van. A vízvirágzás a planktonszervezetek felszíni vizekben való tömeges elszaporodását jelenti. Ilyenkor a vizek felszínén zavarosodás és intenzív elszíneződés figyelhető meg. Toxikus vízvirágzásról abban az esetben beszélünk, ha az ilyenkor nagyszámban elszaporodó planktonikus szervezetek egértesztben toxikusnak minősülő anyagcseretermékeket termelnek. A toxikus vízvirágzást mind prokarióta, mind eukarióta szervezetek okozhatják. A prokarióták csoportjában tartoznak a cianobaktériumok, közöttük toxikus anyagcsereterméket (cianotoxint) termelő és nem termelő szervezetek is előfordulhatnak. A cianobaktériumok toxintermelésének vizsgálata csupán néhány évtizedes múltra tekint vissza, de a cianobaktériumok által termelt toxikus anyagcseretermékeknek tulajdonított mérgezésekről több száz évvel ezelőtről is maradtak fenn feljegyzések.

A Növénytani Tanszék kutatócsoportja a *Aphanizomenon ovalisporum, Microcystis aeruginosa* és a *Cylindrospermopsis raciborskii* nevű fajok cianotoxinjainak analízisével és a cianotoxinok hatásának növényi rendszereken történő tanulmányozásával foglalkozik. A *Microcystis aeruginosa* toxinjairól, a mikrocisztinekről tudjuk, hogy azok a növényi protein foszfatázokat specifikusan gátolják és megzavarják a sejtciklust, a sejtanyagcserét. A *Cylindrospermopsis raciborskii* toxinjairól, azok hatásmechanizmusáról nincsenek ilyen adataink, a fenti szervezet szekunder metabolitjainak a hatásmechanizmusát nem ismerjük.

A kutatási területeink másik iránya a növényekben előforduló biológiailag aktív anyagok tanulmányozása, ezen aktív metabolitok közül a PhD értekezés a pterokarpánokkal és azok tömegspektrometriai vizsgálatával foglakozik részletesen.

Az előbbiek alapján alakítottuk ki a kutatási céljainkat, amely a Balatonból izolált cianobaktérium, a *Cylindrospermopsis raciborskii* egy új, növényi növekedést gátló metabolitjának (cianotoxin) szerkezetfelderítésével és annak a mustárnövény anyagcseréjére

5

kifejtett, tájékoztató jellegű vizsgálatával foglalkozik. A munka során a másik cianobaktérium faj, a *Mycrocystis aeruginosa* cianotoxinjai is az érdeklődési körünkbe kerültek, amelyekben olyan cianotoxinokat találtunk, amelyek ismeretlenek voltak az eddig Magyarországon talált szervezetekben.

A munka során a problémafelvetés természetéből adódóan olyan szerkezetfelderítő megközelítéseket alkalmaztunk, melyek alkalmasak új kémiai struktúrák felderítésére.

A célkitűzéseket az alábbiakban fogalmazhatjuk meg:

- 1. Az 1995-ben a Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* törzs laboratóriumi körülmények között történő nevelésének megvalósítása, a tömegtermelés optimalizálása toxintisztítás céljából.
- 2. A törzs által termelt ismeretlen cianotoxin izolálása.
- 3. A törzs által termelt ismeretlen cianotoxin szerkezetének meghatározása.
- 4. A törzs által termelt ismeretlen cianotoxin hatásának vizsgálata mustár csíranövényeken, gélelektroforézises technikák segítségével.
- 5. A törzs tápanyagéheztetésének tanulmányozása.
- 6. A kis-balatoni vízvirágzásból 2001-ben izolált *Microcystis aeruginosa* cianotoxinjainak szerkezeti meghatározása.
- 7. Egy már ismert biológiailag aktív vegyület deuterált származékainak szintézise az alapváz tömegspektrometriai vizsgálatának céljából.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A cianobaktériumok általános jellemzése

A cianobaktériumok a prokarióták csoportjában tartoznak, azaz a sejttartalom nem különül el citoplazmára és sejtmagra, a nukleoplazmát nem borítja maghártya. A cianobaktériumok genomja a legnagyobbak közé tartozik a prokarióták világában, extrakromoszómális elem, plazmid található bennük, a genom több másolatban van jelen, így mutagénekkel és UV-sugárzással szemben ellenállóak. A cianobaktériumokban található kromatoplazma színes, a centroplazmát veszi körül, glikogén szemcsék (tápanyagraktár) és polifoszfát testek fordulnak elő benne. A cianobaktériumok Gram negatív sejtfalát poliszacharid természetű nyálka fedi¹. A Gram-negatív cianobaktériumok obligált fotoautrofok, szénforrásuk a vízben oldott szén-dioxid, fotoszintézisük során oxigént termelnek. A citoplazmában lévő fotoszintetikus apparátusuk néhány kivételtől eltekintve nem egyezik meg az eukarióták kloroplasztiszában találhatókkal: a tilakoidok nem tapadnak egymáshoz, felszínükön fikobiliszómák találhatóak. Ezen fikobiliszómák felépítése a következő: allofikocianin core, fikocianin- és fikoeritrin rudak valamint linker peptidek; szerepük van a fényabszorpcióban és a PSII-re történő energiatranszferben. A cianobaktériumokon kívül vörös algák kloropasztiszában van még ilyen rendszer. A cianobaktériumokban található egyéb fotoszintetikus pigmentek még a klorofill-a és a karotinoidok. A cianobaktériumokban található karboxiszómák szerepe a szén-dioxid felvétele. A karboxiszómákban Rubisco (ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz) enzim található, a Calvin-cikluson keresztül történik a szén-dioxid fixálása¹. A cianobaktériumok jellegzetessége még a cianoficin szemcse, amely a tilakoid és a citoplazmamembrán között található és nitrogéndepóként működik. A cianobaktériumok vertikális mozgását és fajsúlyszabályzását a **gázvakuólumok** teszik lehetővé¹. A cianobaktériumok között találhatók olyan fajok is, amelyek képesek a légköri nitrogén kötésére. Ezen fajok - kötött nitrogén hiányában - a nitrogénkötést heterociszták segítségével valósítják meg. A heterociszták a vegetatív sejtektől eltérő morfológiájú, nitrogénkötésre specializálódott sejtek, a baktériumfonalban 10-12 vegetatív sejt választja el őket egymástól. Sejtfaluk erősen megvastagodott, egy belső glikolipid és egy külső poliszacharid réteg fedi őket, a vegetatív sejtekből differenciálódnak. A heterocisztákban a vegetatív sejtekhez közel eső oldalon poláros testek találhatóak, melyekbe cianoficin rakódik le.⁴ A heterociszták a fonalas cianobaktériumokban a légköri nitrogén megkötését hajtják végre. A cianobaktériumok

7

elterjedését az akinétaképzés teszi lehetővé. Az akinéták cianobakteriális spórák, melyek gazdag glikogénkészletekkel és tartalék nitrogénnel rendelkeznek. Ezen túlélő képletekkel a légtérben való terjeszkedésre is képes a faj.¹ Alapvető jellemvonásaikat és életmódjukat magyar nyelven Kis Keve Tihamér foglalta össze², de a mikrobiológiai stúdiumok anyagát is képezik³.

2.2. A vízvirágzások és a toxikus cianobaktériumok

A vízvirágzás a felszíni vizekben a planktonszervezetek tömeges elszaporodását jelenti. Ilyenkor a vizek felszínén zavarosodás és intenzív elszíneződés figyelhető meg, jellemző lehet továbbá vízfelületen megjelenő, összetömörülő elhalt planktontömeg, amely hab, hártya, illetve darabos massza formájában jelenik meg⁴ (**1. ábra**).



1. ábra Cianobakteriális vízvirágzás

A cianobaktériumok tömeges elszaporodásának feltételeként négy kritériumot állapítottak meg: (1) szélcsendes vagy enyhén szeles idő, (2) 15-30 °C közötti vízhőmérséklet, (3) pH 6-9 közötti víz pH-érték és (4) elegendő növényi tápanyag.⁶ Toxikus vízvirágzásról abban az esetben beszélhetünk, ha az ilyenkor nagyszámban elszaporodó planktonikus szervezetek egértesztben toxikusnak minősülő mérgező anyagcseretermékeket termelnek.^{4,5} A Földön számos helyen megfigyeltek toxikus vízvirágzást. Az első vízvirágzást Giraldius Cambrensis 1188-ban "írta le" a Langrose-tóban.^{6,7} A XX. század ötvenes évei előtt a vízvirágzás jelensége igen ritka volt.⁸ Jelenleg nem csupán az eutrofizáló (nitrát- és foszfátterhelt) vizekre jellemző és nem mondható ki egyértelműen, hogy a toxikus cianobaktériumok elszaporodását közvetlenül emberi tevékenység okozta szennyezés idézi elő.⁶ Magyarországon először Sebestyén Olga figyelt meg vízvirágzást a tihanyi Kis-öbölben

1934 augusztusában. Ekkor a vízvirágzást a *Microcystis aeruginosa* és *Microcystis flos-aquae* fajok okozták⁹. Azóta többször is megfigyeltek a Balatonban vízvirágzást, melyek közül a legnagyobb visszhangot a *Cylindrospermopsis raciborskii* szervezet tömeges elszaporodása váltotta ki 1994-ben.⁷ A toxikus vízvirágzást nem csak prokarióta, hanem eukarióta szervezetek is okozhatják.^{4,11} Elmondható, hogy a toxikus vízvirágzásokban általában egy domináns cianobaktérium faj a jellemző. Az egyes cianobaktérium törzsek között előfordulhatnak toxikus anyagcsereterméket (cianotoxint) termelő és nem termelő szervezetek is. A toxikus anyagcsereterméket termelő izolátumok toxicitása több nagyságrenddel eltérhet egymástól, így előfordulhat olyan eset is, hogy túlnyomó részben nem toxikus cianobaktérumot tartalmazó biomassza kis mennyiségben jelenlevő toxikus faj miatt erősen toxikusnak mutatkozik.^{4,11}

A toxikus cianobaktériumok elszaporodása akkor különösen veszélyes, ha a vízvirágzás ivóvízkészletet érintő víztéren történik, mivel a cianotoxinokat a szokásos víztisztítási eljárás nem tudja eltávolítani.^{4,12,13} Ráadásul az alkalmazott eljárások a cianobaktériumok lízisét idézhetik elő, ezáltal megnövelhetik az ivóvizek cianotoxin-koncentrációját.4,12,13 Kísérletek folynak a cianotoxinok felszíni vizekből történő eltávolítására, ezek a cianotoxinok megkötésén vagy lebontásán alapulnak. A cianotoxinok megkötésére aktív szenet alkalmaztak, de a módszer drága, ezenkívül a kezelt víz gyakran toxinmaradványokat tartalmazott.¹⁴ A cianotoxinok degradálása történhet klórral.¹⁵ Ezen kísérletek alapján elmondható, hogy a klórral (nátrium-hipoklorit formában) történő lebontás során keletkező melléktermékek (trihalometánok, haloecetsavak) koncentrációja a megengedett határérték alatt marad. Az ilyen módon kezelt vizet transzgén egérkísérletekben vizsgálva, a vizek elfogyasztása nem okozott mérgezési tüneteket, de a cilindrospermopszint, mint cianotoxint tartalmazó vízminta esetén – a minta klóros kezelését követően – zsír rakódott le a hím egerek 40 %-ánál, amire nem tudtak magyarázatot adni.¹⁶ Egy nemrég megjelent közleményben a klórozás kinetikáját vizsgálták cilindrospermopszin és anatoxin esetén.¹⁷ Oxidálószerként nátrium-hipokloritot, monoklóramint valamint kálium-permanganátot használtak.¹⁷ A reakciókra másodrendű kinetikát tudtak felírni, az oxidálószerek közül a klór volt a leghatékonyabb, a legideálisabb pH-értéknek a pH=7 bizonyult. A cianotoxinok lebontása UV-fénnyel is történhet, katalizátorként titán-dioxidot használva. Megállapították, hogy a pH-nak és a szervesanyagtartalomnak hatása van a lebontás sebességére.¹⁸ Tekintettel arra, hogy a cianotoxinok nagyon hidrofil anyagok, mivel poláris (néha ionos) funkciós csoportokat tartalmaznak (cilindrospermopszin), kísérletek folynak olyan adszorbensek előállítására, melyek szelektíven képesek ezen hidrofil toxinokat megkötni, így teszik

lehetővé dúsításukat vízanalízis céljából, illetve eltávolításukat a vízterekből.¹⁹ Mivel a cianobaktériumfajok jelentős része gázvakuólummal rendelkezik, a felszínre tudnak emelkedni. Onnan az áramlatok és a szél a szárazföld felé sodorja a felgyülemlett biomasszát, így halálos dózist jelenthetnek az állatok számára, amennyiben azt elfogyasztják.^{20,21} A humán mérgezéseket általában a cianobakteriális sejteket vagy toxikus metabolitokat tartalmazó ivóvíz, vagy a táplálék elfogyasztása okozza.²² Magyarországon az emberi egészségre legveszélyesebb vízvirágzás a Velencei-tavon történt, amikor a *M. aeruginosa* faj szaporodott el.²³ A Balatonban az 1970-es évektől kezdődően komoly gondot okoz az eutrofizáció a növekvő foszforterhelés következtében. A hatvanas évek végén az *A. flos-aquae* terjedt el, a hetvenes évek végétől kezdődően a *C. raciborskii* és a *M. aeruginosa* is tömegesen fordult elő. 1995-től a tó külső foszforterhelésének csökkenése következtében megindult az oligotrofizálódás folyamata, ami az *A. flos-aquae* újbóli dominanciájával jár együtt.^{23,24,25,26,27,28,29}

2.3. A cianobaktériumok által termelt toxikus metabolitok (cianotoxinok) általános jellemzése

A cianobaktériumok által termelt toxikus metabolitokat két szempont szerint csoportosíthatjuk: kémiai szerkezetük, illetve hatásmechanizmusuk szerint.

Kémiai szerkezet alapján a cianotoxinokat a következő csoportokba sorolhatjuk: ciklikus peptidek, alkaloidok, lipopoliszacharidok.^{4,5,11} A ciklikus peptidek csoportjába tartoznak a mikrocisztinek (*Microcystis, Anabena, Planktothrix* és *Nostoc* fajok termelik) és a nodularin (csak a *Nodularina spumigena* termeli).^{4,5} Ezen ciklikus peptidek szerkezetét az 1980-as évek elején határozták meg, a variánsok száma az 1990-es években ugrásszerűen megnőtt. Kémiai szerkezetükről elmondható, hogy a nodularin esetén öt, míg a mikrocisztinek esetén hét aminosavból álló ciklikus peptidről van szó.^{4,11} Mind a mikrocisztinek, mind a nodularin estén leírtak nem toxikus módosulatokat is. Ilyen esetekben a kettőskötések térállásának változását vagy a glutaminsav acilezését figyelték meg.⁴ Léteznek lineáris mikrocisztin formák, melyek viszont kevésbé toxikusak, mint a megfelelő ciklikus forma; úgy vélik ezek a lineáris formák prekurzorok vagy lebontási termékek.^{4,5} Az alkaloidok csoportjába tartoznak: az anatoxin-a (kis molekulatömegű másodlagos amin, *Anabaena, Planktothrix, Cylindrospermopsis³⁰* és *Aphanizomenon* fajok termelik), az anatoxin-a(s) (ciklikus *N*-hidroxi-guanin észter, amit *Anabaena* fajok termelnek), az aplisiatoxin (*Lyngbya, Schizothrix* és *Planktothrix* fajok termelik), a cilindrospermopszin és a lingbiatoxin (*Lyngbya*

fajok termelik) cianotoxinok⁴. Fontos megemlíteni még a karbamát alkaloid neurotoxinok egy csoportját alkotó saxitoxinokat, melyek előfordulnak szulfátmentes (saxitoxin), egyszeresen szulfatált (goniautoxinok), és kétszeresen szulfatált (C-toxin) formában. Az előbbiek az *Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya* és *Cylindrospermopsis* fajok toxikus metaboltitjai. ^{4,31,32,33} A kémiai besorolás utolsó csoportját a lipopoliszacharidok alkotják, ezek egy cukor-(általában hexóz) és egy lipidrészből épülnek fel. Irritáló toxinok esetén az allergikus reakciót a zsírsavrész válthatja ki, hatásukat a biológiai rendszerek külső felületén fejtik ki.^{1,4} Sejtfalalkotóként minden cianobaktériumban jelen vannak, toxicitásuk fajonként és izolátumonként széles változatosságot mutat.⁴

Hatásmechanizmusuk alapján a cianobakteriális toxinok négy csoportba sorolhatók: neurotoxinok, hepatotoxinok, citotoxinok valamint bőrirritáló és gasztrointesztinális toxinok. A neurotoxinok⁴ az idegrendszert támadják meg, három csoportjuk ismertes: az anatoxin-a az acetilkolin-receptorok antagonistája és posztszinaptikus neuromuszkuláris blokkolóként működik; kötődik az acetilkolin-receptorhoz, összehúzódást vált ki, de az acetilkolin-észteráz nem tudja lebontani, így "túlstimulált állapot" jön létre. Az anatoxin-a(s) gátolja az acetilkolin-észteráz enzimet, megakadályozván hogy az lebontsa a receptorhoz kötődött acetilkolint.⁴ A saxotoxin és neosaxitoxin megakadályozza, hogy az izomsejtekben lévő idegsejtek összehúzódást váltsanak ki.⁴ A hepatotoxinok csoportjába tartoznak a mikrocisztinek és a nodularin. A mikrocisztinek közül több specifikusan gátolja a PP1A és PP2A típusú proteinfoszfatáz enzimeket. A toxin Mdha része kovalensen kötődik az proteinfoszfatáz reakciócentrumába, ezáltal megakadályozza az enzim működését. Mikrocisztin vagy nodularin mérgezés esetén jelentős májkárosodás figyelhető meg. Ennek oka az, hogy a sérült, lekerekedett hepatociták károsítják az endothelsejteket, ami miatt vérzés lép fel a májban. A májsejtek fellazulnak, lekerekednek, később elfajulnak, nekrotizálódnak és a seitmagvak degenerálódnak.^{34,35,36,37,38} A citotoxinok csoportjába tartozik a proteinszintézist gátoló cilindrospermopszin. A cilindrospermopszin genotoxikus hatású is, mivel kromoszómavesztést és DNS-rövidülést okoz.39 Az irritáló és gasztrointesztinális toxinok közé tartoznak a lipopoliszacharidok.⁴ Fontos megjegyezni, hogy bizonyos cianotoxinok által okozott mérgezések esetén egyes emlős szervekben és a külső felszínen elváltozások figyelhetők meg.^{21,40,41} Egy fontos törvényszerűséget érdemes kiemelni a cianobaktériumok toxintermelésével kapcsolatban: egy adott cianotoxin több cianobaktérium törzsből is származhat, egy cianobaktérium törzs pedig több cianotoxint is termelhet.⁴



2. ábra A legismertebb cianotoxinok szerkezeti képlete

2.4. A cianobaktériumok által termelt toxikus metabolitok (cianotoxinok) laboratóriumi vizsgálata

Hosszú időn keresztül a toxikus vízvirágzások jellemzésére egyedül az egértesztet⁴² használták, amely a teljes toxicitás mértékéről néhány órán belül információt nyújthat. Ez a teszt azonban nem nagyon specifikus, illetve érzékeny. Mára már számos, a cianotoxinok bioaktivitásán alapuló egyéb biológiai kimutatási módszert is kidolgoztak.⁴² Így ismeretesek hatékony hepatotoxikus, neurotoxikus, citotoxikus enzimaktivitási és immunológiai interakciókon alapuló kimutatási tesztek.^{4,42,43} Mindezek ellenére – elsősorban tradícionális okok miatt – önmagában egyetlen teszt sem képes az egértesztet helyettesíteni. Az egértesztben hím svájci egereket használnak. A sterilre szűrt és vízzel vagy fiziológiás sóoldattal hígított cianobakteriális sejtek kivonatát vagy a toxikus metabolitokat juttatják az egerek hasüregébe. Az egereket 24 órán keresztül figyelik, a megfigyelt tüneteket és a halál beállta utáni eredményeket használják fel az LD₅₀ értékének megadására. Többfajta cianotoxin együttes jelenléte esetén azonban a gyorsabb hatású elfedi a többi tüneteit.⁴

A BGST (Blue-Green Sinapis Test) egy *in vitro* növényteszt, amelyet Kós és munkatársai⁴⁴ a mikrocisztin kimutatására dolgoztak ki, a teszthez axenikus mustár csíranövényt használnak.³⁶ A teszt kifejlesztése során több növényfajt is kipróbáltak, és bár mindegyik esetén növekedésgátlást tapasztaltak, a cianotoxinokkal szemben a fehér mustár bizonyult a legérzékenyebbnek. A teszt előnye hogy olcsó és a mikrocisztinen kívül más cianotoxinok (cilindrospermopszin) kimutatására is alkalmas.⁴⁵

A biokémiai próbák közül a proteinfoszfatáz inhibíció egy érzékeny módszert jelent a mikrocisztinek és nodularinok kimutatására. A módszer a toxinok biokémiai aktivitásán alapul. Lényege, hogy PP1A és PP2A típusú enzimek által hasított, ³²P-vel jelölt szubsztrátok aktivitását, az eltávolított ³²P mennyiségét méri.^{36,37} Ez a módszer nanogramm/milliliter alatti mikrocisztin-koncentrációt is képes kimutatni az ivóvizekben, így rövid időn belül több minta analízisét teszi lehetővé.⁴

Más tesztekben is a cianotoxinok biokémiai aktivitását használják fel kimutatásukra, például az anatoxin-a(s) esetén az acetilkolin-észteráz gátlást detektálják, sajnos azonban ez a teszt nem szelektív, mert más toxikus anyagokat, például szerves foszfor alapú peszticideket is kimutat.

A legígéretesebb, egértesztet helyettesítő módszerek az ELISA módszerek. Ezt a módszert sikeresen alkalmazzák Kínában a mikrocisztinek detektálására.⁴²

A cianotoxinok detektálására használt kémiai módszerek közül a legelterjedtebb a HPLC-vel történő vizsgálat, ahol alkalmazhatnak UV vagy diódasoros detektort.46,47,48,49 Mivel az UV detektálásnál az azonosítás a retenciós idők alapján történik, standardokra van szükség. A diódasoros detektálás specifikusabb lehet, de az egyedi azonosítás a cianotoxinok hasonló spektruma miatt nem megoldható. Pontos szerkezeti információt szolgáltat a cianotoxinról egy olyan a HPLC-rendszer, ahol detektorként tömegspektrométert használnak. A tömegspektrométer nagy érzékenysége mellett (nagyon kis koncentrációban is képes kimutatni a cianotoxinokat) szerkezeti információt is szolgáltat. A méréstechnikától függően detektálhatunk pozitív vagy negatív töltésű ionokat.^{50,51} Amennyiben tandem készülék áll rendelkezésünkre, SIM (selected ion monitoring) mód helyett választhatunk SRM (selected reaction monitoring) módot⁵², amely még pontosabb azonosítást tesz lehetővé. Dell'Aversano-nak és munkatársainak 2004-ben sikerült megvalósítani a saxitoxin-analógok, a mikrocisztinszármazékok, a cilindrospermopszin és az anatoxin-a elválasztását egy módosított HPLC-rendszerrel Amid-80-as oszlopon, a detektálás során SIM és SRM MS/MS módot is kipróbáltak, a két detektálási módozat között nem volt lényeges eltérés; mindkettő során tisztán elkülönült a cilindrospermopszin és a dezoxi-cilindrospermopszin.⁵³

Jelenleg a leghatékonyabb elválasztási technika az elektroforézis elvén alapul. Kapillárelektroforézis (CE) esetén két pufferoldatot tartalmazó edény között egy 25-100 µm belső átmérőjű, 20-100 cm hosszú kvarckapillárist helyeznek el. A pufferedényekre kapcsolt nagyfeszültség hatására a vizsgálni kívánt komponensek vándorolni kezdenek. A kapillárelektroforézis technikák közé tartozik a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEK). A MEK esetén a mintakomponensek egy micelláris fázis és egy határelektrolit között oszlanak meg, a megoszlás mértéke a meghatározni kívánt anyagokra külön-külön jellemző. Amennyiben anionos felületaktív anyagokat kritikus micellakoncentráció (CMC) feletti mennyiségben adnak az elektrolithoz, olyan micellák képződnek, melyek felülete negatív töltésű, belső terük hidrofób jellegű. A hidrofílebb jellegű komponensek érik el hamarabb a detektort, azokat pedig a hidrofóbbak követik. 1992-ben kidolgozták a mikrocisztinek⁵⁴ és a saxitoxinok⁵⁵ és 2002-ben a cilindrospermopszin⁴⁵ CE-vel történő elválasztását.^{56,57} A cianotoxinok kimutatására vékonyrétegkromatográfiás módszereket is alkalmaznak.^{58,59,60}

2.5. A Cylindrospermopsis raciborskii nitrogénkötő, fonalas cianobaktérium részletes bemutatása

A C. raciborskii szervezetet Jáva szigetén izolálták először⁴ és tipikusan trópusi cianobaktériumként írták le. Azonban mára már mind a trópusi, mind a mediterrán égövi területeken elterjedt faj, amit Európa édesvizeiben is kimutattak.¹⁰ A különböző helyeken izolált törzsek összehasonlítására genetikai vizsgálatokat használtak. Ausztráliában különböző helyeken izolált szervezetek összehasonlítására rpoC1 és STRR szekvenciákat használták.⁶¹ Megállapították, hogy az rpoC1 szekvencia eltér a többi cianobaktérium szekvenciájától, de a C. raciborskii fajon belül nagy hasonlóságot mutat, így alkalmazható a faj azonosítására. Az STRR szekvencia esetén (amelyből három ismeretes) eltéréseket tapasztaltak a különböző izolátumok esetén. 2002-ben európai, ausztrál és amerikai izolátumokat hasonlítottak össze *nif*H és *cpc*BA-IGS szekvenciájuk alapján.⁶² A *nif*H (amely a dinitrogenáz-reduktáz enzimet kódolja, és a légköri nitrogén kötéséért felelős) szekvenciák alapján jól elkülönültek egymástól az egyes kontinenseken izolált törzsek. A *cpc*BA-IGS szekvencia alapján azonban csak az amerikai izolátumok különültek el a többi kontinensen izoláltaktól. 2001-ben thaiföldi izolátumokat azonosítottak 16sRNS szekvenciájuk alapján.⁶³ Egy 2004-ben közölt cikkben japán és thaiföldi C. raciborskii izolátumok STRR és 16SrRNS szekvenciáit vizsgálták.⁶⁴ Megállapították, hogy az egyes izolátumok 16SrRNS szekvenciái nagy homológiát mutatnak, továbbá ezen szekvencia alapján 99,5 %-os egyezést mutattak ki az Ausztráliában izolált törzsekkel. A 16SrRNS szekvencia azonban eltér a más cianobaktériumokban található szekvenciáktól. Az STRR szekvencia alapján a japán és tájföldi izolátumokat két csoportba lehetet sorolni, azonban nem lehetet különbséget tenni toxikus és nem toxikus törzsek között. 2005-ben portugál izolátumok vizsgálata során ITS, 16SrRNS, M13 és ERCI szekvenciákat vizsgáltak.⁶⁵ Megállapították, hogy az ITS és 16SrRNS szekvenciák konzervatívak, így a faj azonosítását teszik lehetővé, míg az M13 és ERIC szekvenciák, mint "ujjlenyomatok"

segítségével az egyes izolátumok között tehető különbség. A faj elterjedésének magyarázatát keresve vizsgálták a négy kontinensen izolált törzsek genetikai diverzitását.⁶⁶ A genetikai vizsgálatokhoz IST1, rpoC1 és nifH szekvenciákat vizsgálták és megállapították, hogy az európai és amerikai izolátumok elkülönülnek az ausztráliai és afrikai izolátumoktól. Az amerikai és európai izolátumok csoporton belül nagy homológiát mutatnak, míg az ausztrál és afrikai csoportban a homológia csak 91 %-os. Megállapították, hogy a polimorfizmus vizsgálatára az említett 3 gén közül az IST1 szekvencia a legalkalmasabb. A faj izolátumainak vizsgálata során megfigyeltek egyenes és feltekeredett cianobaktérium fonalakat is.61,64 A faj trópusi eredetű, de megjelent a mérsékelt övben is, így megvizsgálták a faj hőmérséklettoleranciáját. Azt találták, hogy növekedéséhez 20-35 °C az optimális, alacsony hőmérsékleten (10-19 °C) az izolált törzsek nem nőttek, de amint a hőmérséklet ismételten ideálissá vált, a törzsek növekedésnek indultak.⁶⁴ Brazíliában izolált törzsek esetén is vizsgálták azok hőmérséklet-toleranciáját; azt találták, hogy a növekedéshez a már említett hőmérséklet az ideális, viszont a toxintermelés szempontjából az alacsonyabb hőfok (19-25 °C) a kedvezőbb, ahol a baktériumfonalak növekedése nem olyan dinamikus.³¹ A cilindrospermopszin-szintézis kapcsán kimutatták, az Ausztráliában izolált hogy C. raciborskii törzs 35 °C-on nem termeli a már említett cilindrospermopszint, viszont a toxintermelés újra megindul, amint a hőmérséklet alacsonyabb lesz.67

A *C. raciborskii* 1979 novemberében került a nemzetközi figyelem középpontjába, amikor is az ausztráliai Palm Island-ben 18 gyerek került súlyos, hányásos kiszáradásos tünetekkel kórházba. A Solomon Dan víztározóban a cianobaktérium vízvirágzást idézett elő, amit réz-szulfátos kezeléssel igyekeztek orvosolni, így került a toxikus metabolit, a cilindrospermopszin, az ivóvízbe. Azóta számos más helyen izolált *C. raciborskii* izolátumokból kimutatták a cilindrospermopszint. A cilindrospermopszinon kívül a szervezet más cianotoxinokat is termelhet, ezek lehetnek különböző származékok, például 7-epicilindrospermopszin⁶⁸ (amely hasonlóan toxikus, mint a cilindrospermopszin), illetve a 7-dezoxi-cilindrospermopszin, ⁵³ (amelyről azóta bebizonyították hogy nem toxikus), valamint anatoxin³⁰ és SPS-toxinok, például saxitoxin, gonyautoxin.^{6,9,31,33} 1999 és 2000 között két brandenburgi tó vízvirágzása során a vízvirágzást okozó fajokat és a jelenlévő toxinokat vizsgálták. A toxicitás és a toxinok detektálására CACO-2 és HEP-G2 sejtvonalakat, HPLC-MS/MS rendszert és egértesztet használtak. Az adatok alapján kiderült, hogy a vízvirágzásért a *C. raciborskii* faj a felelős, a terepen izolált biomasszámból cilindrospermopszin tudtak kimutatni. A terepről izolált monokultúrás tenyészetekből – bár

15

metanolos kivonatuk toxikus volt a sejtvonalakra – nem tudták kimutatni a cilindrospermopszin toxint.⁷¹ Hasonló megfigyeléseket tettek az 1999-ban Portugáliában három tóban és egy folyóban izolált *C. raciborskii* törzsek esetében is; az izolátumokból sem saxitoxinokat, sem mikrocisztineket, sem pedig cilindrospermopszint nem tudtak kimutatni. A sejtlizátumokat egértesztben vizsgálták; a cianobaktérium sejtlizátumok toxikusak voltak, de az extraktum fiziológiai hatása eltért a cilindrospermopszint termelő cianobaktériumok hatásától. Ezért felvetődött annak a lehetősége, hogy a *C. raciborskii* szervezet egy eddig még nem azonosított toxikus anyagot termelhet.⁷² A tanszékünk által 1995-ben a Balatonból izolált *C. raciborskii* törzsről munkatársaink kimutatták, hogy nem termeli a szervezetre jellemző toxint, a cilindrospermopszint. A *C. raciborskii* törzsek saxitoxin termelésének változását antibiotikum adása esetén vizsgálták.⁷⁰ Számos tanulmány foglalkozik a *C. raciborskii* kivonatok hatását egerekben vizsgálva megállapították, hogy a kivonatok mind orális, mind hasűregi adagolása máj és vesekárosodást okoz.^{40,41,75}

2.6. A cilindrospermopszin részletes ismertetése

Jelenlegi ismereteink szerint a cilindrospermopszin nevű cianotoxint а raciborskii,^{15,67,76} ovalisporum,^{77,78} *Cylindrospermopsis* az Aphanizomenon az Aphanizomenon flos-aquae,^{79,80} a Raphidiopsis curvata,⁸¹ a Lyngbya wollei⁸² és az Umezakai *natans*⁸³ fajok termelik. Szintézisérért feltehetően a PKS (poliketid szintáz) valamint az NRPS (nem riboszomális peptid szintáz) a felelős, ezen fehérjék génszekvenciáit nem csak a C. raciborskii toxintermelő szervezetből tudták kimutatni.^{79,84}

A cianotoxin 415 Da molekulatömegű, kéntartalmú tricikloguanidinó-uracil származék. Szerkezetét NMR és MS technikákkal igazolták. A cilindrospermopszinnak két származéka ismeretes: a 7-epi-cilindrospermopszin és a 7-dezoxi-cilindrospermopszin.^{63,81,82} 1995 óta számos közlemény jelent meg a cilindrospermopszin és származékainak szintézisével kapcsolatban.^{85,86,87,88,89,90,91} Egy 2000-ben megjelent közleményben a cianotoxin cianobaktériumban történő bioszintézisét tanulmányozták izotópjelzett glicin, acetát, illetve guanidino-ecetsav tápoldatba való adagolásával.⁹² A cilindrospermopszin kimutatására leginkább HPLC-UV,³² HPLC-DAD,⁴⁷ HPLC-MS,^{32,46} HPLC-MS/MS^{50,51} és CE^{45,57} rendszereket használnak. Mivel a kimutatás nyers cianobaktérium-kivonatból történik, szükség van egy hatékony tisztítási módszerre. Ilyen például az a 2005-ben közölt módszer, mely két egymásra épített oszlopból áll. Az első PS polimer oszlop a hidrofób

komponensektől mentesíti a mintát, a második anioncserélő oszlop szelektíven megköti a cilindrospermopszint.⁵⁰ A HPLC-vel történő elválasztáskor C18-as^{47,76} és Amid-80-as oszlop^{50,51,52} is használható. Detektorként (mint már említettem) mind MS, MS/MS (pozitív, negatív mód) valamint DAD detektorokat használnak. Az MS/MS detektorok előnye, hogy SRM (416-194, 416-176, 416-336, 416-274 átmenetek),^{52,53} illetve SIM^{32,50} módban is használhatók. A minőségi meghatározáson kívül szükséges mennyiségi analízis is, amihez HEPES-t (4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav) használnak belső standardként.⁵¹ Biológiai vizsgálatokhoz szükséges a cianotoxinok nagyobb mennyiségben való izolálása. Ehhez a C. raciborskii törzseket laboratóriumban nevelik, majd a megfelelő mennyiségű biomassza összegyűjtése után a cianobaktérium sejteket feltárják. A sejttartalmat szerves oldószerrel (általában metanollal) extrahálják, majd az extraktumot bepárlás után méretkizárásos oszlopon tisztítják. Analitikai tisztaságú cilindrospermopszinhoz preparatív HPLC-vel történő tisztítás során jutnak.^{15,45,93} Stabilitás szempontjából a cilindrospermopszin viszonylag stabilnak mondható: sötétben, 50 °C-on minimális bomlást tapasztaltak, azonban napfény és cianobakteriális pigment jelenlétében 2-3 nap alatt a toxin több mint 90 %-a elbomlott.4,94

A cilindrospermopszinról elmondható, hogy jellegzetes, alkaloid típusú cianotoxin tulajdonsága ellenére hepatotoxikus sajátosságokkal bír, ellentétben a már említett neurotoxikus alkaloid típusú cianotoxinokkal szemben.^{40,41,95,96} A már említett egértesztben 2,1 mg/kg volt az LD₅₀ értéke 24 óra expozíció után.⁴⁰ A toxin biológiai hatását mind állati, mind növényi rendszerekben (pl. dohánypollen⁹⁷) vizsgálták. Állati rendszerben súlyosbodó szervi elégtelenséget okoz, a késleltetett tünetek miatt a megfigyelést időtartamát 7 napra kellett megnövelni⁴⁰. Elektronmikroszkóppal végzett kísérletek bebizonyították, hogy egerekben a toxin fő támadási területe a máj, de jelentős elváltozásokat tapasztaltak a vesében, a szívben és a timuszban is.⁹⁸ A májban történő változásoknak négy lépcsőfoka van: (1) proteinszintézis-gátlás, (2) membránproliferáció, (3) zsírcseppek akkumulálódása és (4) sejthalál.⁹⁸ *In vitro* kísérletek igazolták, hogy gátolja a glutation-, illetve fehérjeszintézist.^{99,100} Azt is kimutatták, hogy a CYN *in vitro* körülmények között nem kompetitív módon gátolja az uridin monofoszfát szintáz komplexet.¹⁰¹ Egy 2002-ben megjelent tanulmány rámutat arra, hogy májsejtekben halálos dózisú CYN adását semlegesíteni lehet kolát és taurokolát adagolásával.¹⁰²

2.7. A Microcystis aeruginosa és a mikrocisztin

A *Microcystis aeruginosa* a vízvirágzásokban leginkább előforduló cianobaktérium, egysejtű sokezres kolóniát alkotó szervezet. A Gram-negatív sejtfal külső rétege közös kocsonyaburokban tartja össze a sejteket.

A mikrocisztinek a cianobaktériumok által termelt, a mérgezésekért felelőssé tehető cianotoxinok legkutatottabb csoportját alkotják. Mérgezési tüneteik anatómiai elváltozások alapján a hepatotoxinok csoportjába sorolhatók. Termelésükre több faj is képes: Microsistis, Oscillatoria, Nostoc, Anabaena, Anabenopsis, Planktothrix.^{4,5} Először 1959-ben Bishop és munkatársai azonosították *M. aeruginosa*-ból.¹⁰³ Később dél-afrikai és ausztráliai tenyészetekből is izoláltak hasonló toxikus tulajdonságú, de nem teljesen azonos aminosavösszetételű mikrocisztineket. 1982-ben Eloff és munkatársai felismerték, hogy egy izolátum többféle toxin termelésére is képes.⁴ Az általános aminosavszekvencia a következő: D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha. Az aminosavak között D- és L-aminosavak egyaránt vannak, az X és Z helyeken találhatók a cserélhető L-aminosavak, ez a névben is megjelenik, így például a MYC-LR esetén a leucin és az arginin a két cserélhető aminosav. Toxicitás szempontjából az Mdha és az Adda kulcsfontosságú.^{104,105} Napjainkban több mint 60 féle mikrocisztin ismeretes,⁴ ezek molekulatömege 900-1100 Da. A mikrocisztinek kémiailag stabil, hőhatásnak ellenálló molekulák, lebontásukhoz megfelelő enzimrendszer szükséges. A lebontás első lépésében a mikrocisztináz enzim hatására a ciklikus mikrocisztinmolekula linearizálódik, majd ezt a linearizált molekulát egy megfelelő enzimrendszer aminosavakra bontja.⁴⁴ Biológiai rendszerekre gyakorolt hatásukkal kapcsolatban elmondható, hogy például a mikrocisztin-LR az enzimfelszín három különböző régiójához kapcsolódik, ezzel meggátolja a szubsztrát kapcsolódását az enzimhez.^{106,107}

2.8. A környezetei tényezők hatása a cianobaktériumokra

Mind a terepi, mind a laboratóriumi adatok mutatják, hogy a környezetei tényezők, mint például a fény, a hőmérséklet, a tápanyagok és a nyomelemek befolyásolják a cianobaktériumok toxintermelő képességét.^{4,108,109} Bebizonyították, hogy a toxintartalom a növekedés késői exponenciális fázisában a legmagasabb.¹¹⁰ Vizsgálták a mikrocisztintermelést nitrogén- és foszforlimitált, valamint optimalizált laboratóriumi körülmények között.^{110,111} Mivel a *M. aeruginosa* nem nitrogénfixáló cianobaktérium, ezért a kötött nitrogén csökkentése limitálja növekedését, ez az általános stresszreakció csökkenti a

mikrocisztintermelést.¹¹² Nemrégiben közölt adataink rámutattak arra, hogy az *Aphanismenon ovarisporum* esetén a kén-, illetve foszforlimitált környezet hat a cilindrospermopszin-termelésre.¹¹³

2.9. A pterokarpánok

A természet színpompáját nyújtó színezőanyagok csoportjába tartozó flavanoidokra Kostanecki és munkatársainak¹¹⁴ az 1890-es években megkezdett úttörő kutatásai hívták fel a figyelmet. Flavanoid összefoglaló névvel elsősorban a C₆-C₃-C₆ szénvázat (difenil-propán vázat) tartalmazó anyagokat illetjük, de e vegyületcsoportba soroljuk a C₁₅+C alapvázzal rendelkező homoizoflavanoidokat és rotenoidokat is. A pterokarpánok a természetben előforduló izoflavanoidok egyik farmakológiailag is értékes csoportját alkotják. Számos képviselőjük figyelemre méltó fungicid hatásuk révén a növényi fitoalexinek családjába is sorolható.^{115,116,117} A legújabb kutatások rámutattak arra, hogy a pterokarpán váz származékai hatásos cikooxigenáz,¹¹⁸ valamint kígyóméreg elleni szerek.¹¹⁹ Egy 2006-ban megjelent közleményben beszámoltak arról, hogy a (+)-3,4dihidroxi-9-metoxi pterokarpán és a (+)3-hidroxi-9-metoxi pterokarpán a humán leukémia sejtek apoptózisát idézik elő.¹²⁰

Annak ellenére, hogy a pterokarpán vázat tartalmazó vegyületek kémiai és spektrális tulajdonságát már részletesen vizsgálták^{121,135} meglepő módon tömegspektroszkópiai viselkedésükről csak kevés adat lelhető fel az irodalomban.

Először Pelter és munkatársai¹³⁶ számoltak be pterokarpán származékok El tömegspektrometriai sajátosságairól és megállapították, hogy a pterokarpán esetében a kromon vagy kromanon vázat tartalmazó izoflavonoidokra jellemző, úgynevezett retro-Diels-Alder (RDA) átalakulás a molekulaion fragmentációja során nem megy végbe (**3. ábra**):



3. ábra A krom(an)on váz RDA átalakulása

Az feltüntetett fragmentáció során a molekulaion ($[M]^+$) a kromángyűrű oxigénatomja melletti hidrogént gyökként elveszíti, így az $[M-H]^+$ ion keletkezik. Ezenkívül jellegzetes fragmentációs lépés még a gyűrű felnyílást követő gyűrűhasadás, ami egy benzofurán származékot (m/z 162) eredményez (**4. ábra**).



4. ábra A Pelter és munkatársai által vázolt fragmentációs elképzelés

Sanduja és munkatársai¹³⁷ 1979-ben 2'-hidroxi- és 2'-metoxi-izoflavanoidok EI tömegspektroszkópiai viselkedéséről számoltak be. Először mutatták ki, hogy e vegyületek molekulaionja a 2' helyzetű szubsztituens gyökként való vesztése után pterokarpán vázas ionná alakul át (**5. ábra**)



5. ábra A 2' helyzetű szubsztituens vesztése által bekövetkező ciklizáció

1990-ben Mizuno és munkatársai¹³⁸ a *Cladrastis platycarpa* növényből izolált (–)-2,3-dihidroxi-8,9-metiléndioxi-pterokarpán, ((–)-2-hidroxi-maackiain) EI tömegspektrometriás vizsgálata során az észlelt m/z 163 és m/z 175 ionokhoz a **6. ábra** szerinti szerkezeteket rendelték.



6. ábra A Mizuno és munkatársai által feltételezett fragmentáció

Az eddigi irodalmi adatok arra utalnak, hogy a pterokarpán váz esetében a 6, 6a és 11a helyzetű hidrogénatomoknak a molekulaionok fragmentációja során döntő szerepük van. Logikusnak látszott, hogy a fent említett fragmentációs hipotéziseket deuterált származékok tömegspektrometriai vizsgálatával igazoljuk.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok és eszközök

Munkánk során a centrifugáláshoz Beckman Avanti J25 centrifugát és JA10, JA20, valamint JA18.1 rotorokat, a vékonyrétegkromatográfiás vizsgálatokhoz Merck Kieselgel 60 F_{254} típusú szilikagélréteget használtunk. A szilikagéles oszlopokat az eluenssel nedvesített Merck Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm szemcseméret) szilikagéllel töltöttük meg. A HPLC-s elválasztáshoz diódasoros UV-VIS detektorral ellátott Shimadzu UV/VIS 1601 készüléket használtunk Supelco Supelcosil SPLC-18 (35 x 10 mm x 5 µm) oszloppal. Használt frakciószedő: Pharmacia Fine Chemicals Frac-300.

3.2. A munka során vizsgált cianobaktérium törzsek és azonosításuk

A kutató munka során a Balatonból 1995-ben izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* (BGSD 266) és a Kis-Balatonból 2001-ben izolált *Microcystis aeruginosa* (3T) törzset vizsgáltuk. A szervezeteket a Növénytani Tanszék munkatársai azonosították Olympus BX-50 fénymikroszkóp segítségével a Vasas által leírt módon¹²³. A fajok meghatározásához Felföldi¹³³ és Komárek¹³⁴ határozó műveit használtuk.

3.3. A planktonikus cianobaktériumok izolálása és nevelése laboratóriumi körülmények között

Cylindrospermopsis raciborskii (BGSD 266):

A hígításos módszerrel történő monocianobakteriális tenyészet létrehozása után a laboratóriumi neveléshez híg agart (0,1%) tartalmazó petricsészét, valamint Erlenmeyerlombikban (100 ml-es; 30 ml tápoldat) rázatott tenyészeteket (120 fordulat/perc, News Brunswick), illetve cumisüvegben (250 ml-es) és Erlenmeyer-lombikban (1 és 5 literes) buborékoltatott tenyészeteket használtunk. A cumisüvegben nevelt tenyészetekkel végeztük a növekedési kísérleteket. A tömegtenyészetek inokumlumának előállítására a 250 ml-es tenyészeteket használtuk, amit 1 literes Erlenmeyer-lombikba oltottunk. A cianotoxin izolálásához szükséges biomasszát biztosító, Allen tápoldatot tartalmazó 5 literes Erlenmeyerlombikot oltottuk az 1 literes tenyészetekkel. A törzsek fenntartásához BG-NO₃, illetve Allen tápoldatokat használtunk.¹²⁴ A tenyészeteket fényen (35-100 µmol foton [·]m⁻²·s⁻¹) neveltük, a megfelelő keveredést, illetve a CO₂-koncentrációt a rázatott lombikokban rázógéppel (100-120 rpm), a buborékoltatott lombikokban steril levegő segítségével értük el. A nevelőhelyiség hőmérséklete 28 °C volt. Ezen a hőmérsékleten a tenyészeteknek nem szükséges plusz CO₂-ot biztosítani.

Microcystis aeruginosa (3T):

A törzset a Növénytani Tanszék munkatársai, a kis-balatoni vízvirágzásból 2001-ben izolálták oly módon, hogy a víz felszínén úszó biomasszát üvegbe, a vízmintát üvegszcintillációs küvettába gyűjtötték. A toxicitási vizsgálatokra szánt biomasszát tartósítószer nélkül, hűtőszekrénybe helyeztük, majd hígitásos módszerrel monocianobakteriális tenyészetet állítottunk elő.

3.4. A fehérmustár-növényteszt (Blue-Green Sinapis Test)

Laboratóriumunk korábban megállapította, hogy a mustár csíranövények alkalmasak a cianotoxinok kimutatására, a módszert Blue-Green Sinapis Test-nek nevezték el.23 A mustár csíranövény teszt alkalmazása több szempontból is kedvező és alkalmas cianotoxinok tisztításánál és azonosításánál. Egyrészt gyors módszer: 1 napos csíráztatás és 3-4 napos nevelés után értékelhető adatokat biztosít, másrészt egyszerű: a módosított mustár csíranövény teszt 96-os Titertech-lemezen több ismétlésben elvégezhető. Harmadszor: könnyen kezelhető, mert a csíráztatott mustármag mérete megfelelő az ültetéshez, a kifejlődött növény hosszadatai pedig könnyen lemérhetőek. Negyedszer: reprodukálható adatokat ad, mivel az előcsíráztatás révén kizárólag csírázásnak indult és azonos méretű magokat használtunk. Ötödször: költségkímélő, mivel csak a mustármagokat és a nevelő "plateket" kell biztosítani, ellentétben az egérteszttel, amely használata ellen az állatvédők is tiltakoznak. A teszt első lépése a használt mustármagok sterilezése és csíráztatása volt. Azért használtunk előcsíráztatott magokat, mert már a korábbi vizsgálatok alkalmával bebizonyosodott, hogy az előcsíráztatásnak köszönhetően, a növényi minták homogénebbek és nem kell foglalkozni a csírázási százalék okozta esetleges hibával. A sterilezés után, 16-24 óra elteltével a kb. 3 mm gyököcskével rendelkező magokat agarral szilárdított cianotoxintartalmú táptalajra tettük. A növekedésgátlást a mustárnövények tengelyszerveinek hosszadataival jellemeztük. A növénykísérleteket az előzetes adatok alapján etiolált körülmények között végeztük. A tiszta mikrocisztin-LR-rel, illetve *M. aeruginosa* nyerskivonattal munkatársaim által végzett kísérletek bizonyították, hogy az etiolált növények érzékenyebben jelzik a cianotoxin jelenlétét, mint a fotoperióduson neveltek. Sötétben nevelve, kísérlettől függően 2, 3 vagy 4 nap elteltével lemértük a növényke hypokotyl-, gyökér-, sziklevél- és teljes hosszát, az adatokat milliméterben adtuk meg.¹²⁵ A növényi növekedésgátlás meghatározására mind a nedvestömeg, mind a hosszadatok alkalmasak. A hosszadatok lemérése időigényesebb, de pontosabb eredményt ad, ugyanis a nedvestömeg eredményeket a gyors nedvességvesztés valamint a gyökérzetre tapadt agar meghamisíthatja. Ezért, közvetlenül a mérés előtt vettük ki az agarból a növényeket és alaposan megtisztítottuk gyökérzetüket a rátapadt agartól.

A kromatográfiás eljárásoknál alkalmazott toxicitási teszteknél az ültetéstől számított 3 nap elteltével mértük le a mustárnövény hosszadatait.

3.5. A Cylindrospermopsis raciborskii növekedési görbéjének meghatározása

A *C. raciborskii* növekedési görbéit A_{800} , klorofill-a¹²⁶ és fehérjetartalom¹²⁷ mérésekkel, illetve száraztömeg méréssel határoztuk meg. A növekedési görbék felvételéhez az előnevelt, exponenciális fázisban lévő tenyészeteket centrifugáltuk (6370 g, 3 perc) majd a szuszpenziót óvatosan a tápoldatokba pipettáztuk úgy, hogy a kezdeti A_{800} 0,2-nél nagyobb legyen. A különböző mérési módszerekhez felhasznált minták mennyiségeit az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat A növekedési görbék meghatározásához felhasznált mintamennyiségek

Módszer	Klorofill-a	Fehérjetartalom és gélelektroforézis	A ₈₀₀	Szárazanyag- tartalom	VRK
Mintamennyiség	3 ml	2 ml	1 ml	2 x 2 ml	2 ml

Az A₈₀₀ értékeket a vizsgálat időpontjában mértük, a további értéket a kísérletsorozat végén együtt határoztuk meg, a mérési hiba minimalizálásának érdekében.

3.6. A spektrofotometrálás körülményei

Az fényabszorpció mérésekhez – klorofill-a, fehérjetartalom, A₈₀₀, kromatográfiás frakciók elnyelése 210, 240 és 260 nm-en – valamint az UV-VIS spektrumok felvételéhez Shimadzu UV/VIS 1601 típusú spektrofotométert használtunk.

3.7. A klorofill-a tartalom meghatározása

A tenyészet klorofill-a tartalmát úgy határoztuk meg, hogy a tenyészetekből 3 ml mintát centrifugáltunk, majd a csapadékot 200 μ l tápoldatban szuszpendáltuk. Ezt a 200 μ l-es mintát lefagyasztottunk, majd a kísérletsorozat végén minden egyes mintához 800 μ l hideg acetont adtunk. A mintát időnként megkeverve jégen 30 percig állni hagytuk, majd 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk (12000 g). A felülúszót 663 nm-en fotometráltuk, a klorofill-a tartalmat az extinciós koeficiens (ϵ) segítségével határoztuk meg (ϵ = 82,04 mg/ml).¹²⁶

3.8. Az A₈₀₀ értékének meghatározása

A cianobaktérium tenyészetből vett minta abszorbanciáját közvetlenül a mintavétel után 800 nm-en UV-spektrofotométerrel mértük (lásd a 3.6. fejezet).

3.9. A fehérjetartalom meghatározása

A tenyészetből naponta vett mintákat centrifugáltuk (12000 g, 5 perc, szobahőmérséklet), majd a felülúszót eltávolítottuk és a sejteket lefagyasztottuk. A kísérletsorozat végén a mintákat steril desztillált vízzel 50 µl-re egészítettük ki és 50 µl 10 mM pH=7,5 Tris-HCl pufferoldatot adtunk hozzájuk. A sejtek beltartalmát háromszori fagyasztással-olvasztással tártuk fel, és Bradford módszerével¹²⁷ (556 nm-en mért abszorbancia) határoztuk meg a fehérjetartalmat, háromszoros ismétlésben.

3.10. A szárazanyagtartalom meghatározása

A tenyészetekből minden nap 2 x 2 ml mintát vettünk 3 ismétlésben, melyeket centrifugálás (12000 g, 5 perc) után egyesítettünk. A kísérletsorozat végén a mintákat liofilizáltuk és kiszámítottuk az 1 ml tenyészetben található cianobaktériumok tömegét.

3.11. A toxicitás meghatározása mustárnövény teszttel

A cianobaktériumtenyészetekből 4 ml mintát vettünk, melyet centrifugáltunk (12000 g, 5 perc), majd a felülúszó eltávolítása után lefagyasztottunk. A kísérletsorozat végén a

mintákat kiolvasztottuk és steril desztillált vízzel 150 µl-re egészítettük ki. Az így kapott szuszpenzióhoz 75 µl 3%-os agart adtunk. A megszilárdult agar felszínére egy előcsíráztatott, axenikus mustármagot helyeztünk, majd 3 nap elteltével lemértük a csíranövények hosszadatait.¹²⁵ Kontrollként cianobaktériumtenyészet nélküli 1%-os agart használtunk és a kísérleteket 3 párhuzamossal hajtottuk végre.

3.12. A cianotoxintartalom változásának vékonyrétegen történő nyomonkövetése

A cianotoxintartalmat vékonyrétegkromatográfia segítségével határoztuk meg. A tenyészetekből naponta vett 2 ml mintát centrifugáltuk, majd a felülúszó eltávolítása után a csapadékot lefagyasztottuk. A mintákat a kísérletsorozat végén liofilizáltuk, majd 20 µl víz-metanol 1:1 elegyében szuszpendáltuk. Ebből az elegyből 3 x 2 µl-t vittünk fel centrifugálás után a szilikagél vékonyrétegre. A futtatóelegyek a következők voltak: etilacetát-izopropanol 6:2, izopropanol-etilacetát-víz 10:6:1. A vékonyréteget 365 nm-es fénnyel megvilágítva az izolált cianotoxinok foltjai jól láthatók.

3.13. A C. raciborskii sejtek előkészítése a toxikus metabolitok izolálására

A késő exponenciális vagy stacioner fázisba jutott (3 hét nevelés után) tenyészetet centrifugáltuk (6870 g, 5 perc) és a sejteket fagyasztásos-olvasztásos módszerrel feltártuk és –20 °C-on tároltuk. A feltárt sejtszuszpenziót 4-szeres térfogatú 75%-os metanollal egy éjszakán át hűtőben (4 °C-on) mágneses keverővel kevertettük (extrakció), majd az így kapott szuszpenziót centrifugáltuk (12100 g, 20 perc). A felülúszó szerves oldószer tartalmát rotációs bepárlón, vákuumban elpárologtattuk. A metanolos extrakcióval elsősorban a fehérjéket és más, metanolban nem oldódó makromolekulákat távolítottuk el.

3.14. A toxikus anyagcseretermékek izolálásához használt kromatográfiás eljárások

A toxikus anyagcseretermékek tisztítása három, különböző típusú töltetet (DEAE-52, Whatman anioncserélő; Toyopearl HW-40 molekulaszűrő; szilikagél) tartalmazó oszlopon történt. A végső tisztításhoz HPLC eljárást használtunk.

3.14.1. Az anioncserélő oszlop (DEAE-52, Whatman) elkészítése

Az oszlop (3,8 x 15 cm) töltetét a gyártó javaslatai szerint a következő módon készítettük elő. Az így előkészített töltetet a megfelelő méretű oszlopba töltöttük és állni hagytuk, majd tömörödés céljából egy éjszakán át eluáltuk. Ezután 3 órán keresztül kondícionáltuk, 10 mM pH=7,5 Tris-HCl pufferoldattal, majd előkészítettük a sógradienst, amely 2 x 280 ml 10 mM pH=7,5 Tris-HCl pufferoldatból áll, az egyik 0,2 M koncentrációban NaCl-ot tartalmazott. A sógrádiens oszlopra juttatása perisztaltikus pumpával történt. A kromatográfia során 200 csepp/kémcső (kb. 8 ml) frakciókat gyűjtöttünk frakciószedő segítségével.

3.14.2. A Toyopearl HW-40 oszlop előkészítése

A molekulaszűrő töltetet (HW-40) az eluensben (50%-os etanol) szuszpendáltuk, majd buborékmentesen a kromatográfiás oszlopba (3 x 60 cm) töltöttük. Ezután egy napig ülepedni hagytuk, majd egy liter eluens átfolyatásával tömörítettük és kondícionáltuk. Az eluenst perisztaltikus pumpával juttattuk az oszlopra. A mintákat 50 %-os etanolban oldva vittük fel a töltetre és 400 csepp/kémcső (kb. 4 ml) frakciókat szedtünk frakciószedő segítségével.

3.14.3. A szilikagéloszlop elkészítése

A száraz szilikagélt az eluensben (izopropanol-etilacetát-víz 10:6:1 elegye) szuszpendáltuk, majd a kromatográfiás oszlopba (3 x 48 cm) töltöttük és egy éjszakán át állni hagytuk. A mintát az eluensben oldva vittük fel a töltetre és 400 csepp/kémcső (kb. 6 ml) frakciókat szedtünk.

3.14.4. A HPLC tisztítási módszerek

A minták HPLC-vel történő tisztításakor Supelco Supelcosil SPLC-18 (35x10 mm, 5 μm) szemipreparatív oszlopot, eluensként 3% metanolt és 0,1% TFA-t tartalmazó desztillált vizet használtunk. Az elválasztást 40 °C-on végeztük, az injektált minta mennyisége azonosítás esetén 50 μl, míg a szemipreparatív tisztítás esetén 300 μl volt. Az áramlási sebességként 3 ml/perc-et alkalmaztunk.

Minden kromatográfiás lépés után a kapott frakciókat 210, illetve 260 nm-en fotometráltuk. Amennyiben szükséges volt, ehhez a mintákat 10-szeresére hígítottuk a 0–2 abszorbancia tartomány elérése céljából.

3.15. A kromatográfiás frakciók toxicitásának meghatározása

A frakciók toxicitását a mustár csíranövény teszttel vizsgáltuk.²³ DEAE- és szilikagéloszlop esetén az egyes frakciókból 200 µl-t használtunk a növényteszthez. Toyopearl-oszlop esetén 2 x 200 µl-t alkalmaztunk. A mintát 96 helyes Titertech-lemezre vittük és 40 °C-on beszárítottuk. Az egyes kamrákba 1%-os agart pipettáztunk, erre kerültek az előcsíráztatott mustármagok.

3.16. A vékonyrétegkromatográfia

Az egyes frakciókból 3 x 2 μl-t vittünk fel 20 x 20 cm-es szilikagél-lapra, majd először izopropanol:etil-acetát 1:6 elegyében, majd a réteg megszáradása után izopropanol:etil-acetát:víz 10:6:2 összetételű elegyben futtattunk.

3.17. Az NMR analízis

Az ¹H, ¹³C, HSQC, COSY, HMBC és NOESY mérések Bruker DRX-500 műszeren készültek 500 (¹H), illetve 125 (¹³C) MHz-en, oldószerként D₂O-ot, illetve d₆-DMSO-ot használva, 298 K hőmérsékleten.

A molekulák szerkezetének pontos meghatározásához elengedhetetlenek az úgynevezett *többdimenziós mérések*, melyeknél az egyik dimenzióban a protonok kémiai eltolódásainak értékei, míg másikban protonok vagy szénatomok kémiai eltolódásainak értékei szerepelnek attól függően, hogy *proton-proton* vagy *proton-szén* spektrumról beszélünk. Előbbiből a proton-proton, utóbbiból a proton-szén korrelációkat ismerjük meg. A proton-proton kölcsönhatás létrejöhet kovalens kötésen keresztül (csatolás), illetve térben is (NOE), amennyiben a hidrogénatomok egymáshoz képest meghatározott távolságon belül helyezkednek el (1.6–5 Å). A kötésen keresztül létrejövő kölcsönhatás erőssége függ a két kölcsönható atom között elhelyezkedő kötések számától, azok növekedtével a kölcsönhatás erőssége, így a jelintenzitás csökken. Általában 1, 2 és 3, néhány speciális esetben 4 kötésen átterjedő csatolásokkal találkozunk.¹²⁸ Az ismeretlen cianotoxin szerkezetének meghatározásához a következő többdimenziós NMR-technikákat hívtuk segítségül:

COSY (COrrelation SpectroscopY): ebben a mérésben mindkét dimenziót protonspektrumok alkotják. A spektrumból megtudhatjuk, hogy az adott proton milyen más protonnal vagy protonokkal csatol, azaz mely protonok vannak tőle 3 kötésnyi távolságon belül.

TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY): hasonlóan a COSY-hoz mindkét dimenzióban protonok szerepelnek, a mérésből feltérképezhetők az egy spinrendszerbe tartozó hidrogének.

NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY): az egymással térközelségben lévő hidrogénatomok között kölcsönhatás jön létre (NOE), tehát a molekula konformációjának felderítésére alkalmas ez a módszer.

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation): az egyik dimenzióban protonspektrum, a másikban szénspektrum található. A spektrumból megállapítható, hogy melyik proton közvetlenül melyik szénatomhoz kapcsolódik.

HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation): hasonló a HSQC-hez, csak ez esetben a több kötésen (általában 2-3) át kialakuló proton-szén kölcsönhatások is megfigyelhetők.

3.18. A tömegspektrometriai mérések

A szerkezet meghatározásához szükséges tömegspektrometriai mérések az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometriai laboratóriumban készültek ESI-Q-TOF, illetve Q3 típusú készüléken, valamint a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén működő Brucker Biftex MALDI-TOF készüléken. A MALDI mérések esetén a készülék kalibrálása maltooligoszacharidokkal történt (m/z = 527,15, 689,21, 851,26 és 1013,31). A spektrum felvételekor 2,5-dihidroxi-benzoesav (DHB) mátrixot használtunk (10 mg DHB 0,5 ml etanol:víz 1:1 elegyben), a minta deszorpcióját/ionizációját 337 nm-es nitrogénlézerrel végeztük. A pontos tömegméréseket ESI-Q-TOF készüléken végeztük pozitív módban, kalibrálással. A módszer lényege az, hogy a mintához kalibráló anyagot (leucin-enkefalin) adunk, amely fragmenseinek ismerjük a pontos, azaz négy tizedesjegyű tömegét. Egy, a vizsgálni kívánt anyag közelében lévő ilyen fragmensre korrigálva a tömegskálát megmérhetjük a vizsgálni kívánt komponens pontos tömegét. A Q-TOF készülék magában egyesíti a TOF (Time Of Flight, repülési idő) valamint a Q3 készülékek tulajdonságait. A mintát elektronspray körülmények között ionizáltuk, amely egy lágy ionizációs technikának tekinthető, így hőbomlékony biológiai minták is vizsgálhatók vele. A gőzfázisban lévő, pozitív töltéssel rendelkező ionokból kiválasztott ion az ütközési cellába kerül, ahol az ütközési gázzal ütközve (ez általában nitrogén) fragmentálódik. Az így kapott fragmensek a TOF analizátorban tömeg/töltés arányuknak megfelelően detektálásra kerülnek. Mivel a repülési idő analizátor 4 tizedesjegy pontossággal tudja megadni az ionok tömegét, lehetőség van a fragmens ionok elemi összetételének meghatározására.

A mikrocisztinek azonosítása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén működő FAB készüléken történt.

3.19. Az IR spektrumok

Az IR spektrumokat a Debreceni Egyetem TEK Szerves Kémiai Tanszékének IR készülékén (Perkin Elmer 16 PC FT-IR) vettük fel KBr-tablettában.

3.20. A cianobakteriális nyers kivonattal történő kezelés hatásának vizsgálata mustár csíranövényeken

Az előkísérletekhez a kísérleti rendszerünket a következők szerint állítottuk össze: a stacioner fázisban lévő C. raciborskii (BGSD 266) cianobaktérium tenyészetet centrifugáltuk, majd liofilizáltuk. Az így kapott száraz anyagból szuszpenziót készítettünk. A mustármagokat a már leírt módon előcsíráztattuk, és a nyers kivonatot megfelelő koncentrációban tartalmazó (200, 400, 800, 1600, 3000 és 6000 µg/ml, szárazanyag) 1%-os agarra helyeztük. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a Titertech 96-os lemez helyett, amelyben 200 µl agarra egy darab mustármagot helyeztünk, célszerűbb 24-es lemezt használni, mivel ekkor a használható agar mennyisége 1 ml, amelyre kényelmesen ráhelyezhető 4 db mustármag. Ebben az esetben a mért hosszadatok között lényegesen kisebb szórást tapasztaltunk. Mivel a kísérletsorozat során nem csak a toxinhatás koncentrációfüggését, hanem annak időfüggését is vizsgálni kívántuk, a magok ültetését követő 2. 3. és 4. napon megfelelő számú mustárnövényből (átlagosan 10 db) nyers kivonatot készítettünk. A mustárnövény kivonat készítéshez a csíranövényeket kevés kvarchomok segítségével dörzsöltük el. A kivonatkészítés előtt lemértük a növények hosszadatait és a nedvestömegüket. A nedvestömeg adatok alapján határoztuk meg a kivonó puffer mennyiségét. A kivonatok elkészítéséhez 10 mM pH=7,5 Tris-HCl puffert használtunk, amely megfelelőnek bizonyult mindkét típusú gél elektroforézishez: natív (proteáz, nukleáz) és denaturáló SDS. A kapott kivonatok fehérjetartalmát Bradford módszerével határoztuk meg. Az SDS gélelektroforézis vizsgálatokhoz "Cracking" puffert használtunk, abból 4-szeres töménységűt adtunk 1:3 arányban a mintához. A "Cracking" mintapuffer összetétele a következő volt:

B2 puffer (0,5 mM, Tris-HCl pH=6,8):	125 µl,
SDS (20%-os):	150 µl,
glicerin (50%-os):	100 µl,
merkapto-etanol (cc.):	50 µl,
desztillált víz:	75 µl.

A natív, proteáz és nukleáz gélekhez 4-szeres töménységű, csökkentett SDS-tartalmú (0,01 %) mintapuffert használtunk.

3.21. A mustárnövények cianotoxinnal történő kezelése és a kezelés hatásának vizsgálata

A mustárnövények tisztított toxinnal történő kezelése során vizsgáltuk a cianotoxinhatás koncentrációfüggését. Az előkísérletek tapasztalatai alapján 200, 400, 600, 800 és 1600 µg/ml-es koncentrációkat használtunk és az ültetéstől számított 2., 3. és 4. napon vettünk mintát. 24 helyes lemezen dolgoztunk, 1 ml össztérfogat mellett, koncentrációkként 5 db mustárnövénnyel. Minden méréshez kontrollnövényeket is használtunk. A növények tömegét és hosszadatait kivonatkészítés előtt lemértük, majd a nyers kivonatos kezelésnél használt pufferrel (lásd korábban) növényi kivonatot készítettünk. Ezek fehérjetartalmát is Bradford módszerével határoztuk meg. Mintapufferként itt is "Cracking" mintapuffert használtunk.

3.22. A fehérjemintázat vizsgálata gélelektroforézissel

A cianotoxinnal kezelt mustár növények fehérjéinek elválasztásához 20 x 20 x 0,1 cm-es, SDS tartalmú gradiens (10-18 %) poliakrilamid gélt használtunk.¹²⁹ A "Cracking" puffert tartalmazó mintákat 3 percen át tartó forralása után az előkészített poliakrilamid gélen futtattuk meg (7 mA/lap, egy éjszakán át, 20 °C-on). Az 5,5 %-os felső koncentráló gél mintatartó helyeire 20 µg fehérjének megfelelő fehérjekivonatot vittünk fel úgy, hogy a minták térfogata azonos legyen. Minden méréshez kontrollnövényeket is használtunk. A mintákkal párhuzamosan az egyes fehérjék molekulatömegének meghatározására szolgáló molekula tömegmarkert (Pharmacia, LMW Calibration kit) is futtatunk, melyet a mintához hasonlóan 3 percig forraltunk a gélre vitel előtt. A megfuttatott géleket Comassie Brilliant

Blue R-250 oldattal megfestettük és lefotóztuk. A kiértékelés Sigma-Gel szoftver segítségével történt.

3.23. Az ssDN-áz aktivitás vizsgálata gélelektroforézissel

A mustárnövény kivonatokhoz (10 µg fehérjetartalom) csökkentett SDS-tartalmú puffert adtunk, mivel azt tapasztaltuk, hogy a nagy mennyiségű SDS jelenléte a pufferben csökkenti a sávok intenzitását a natív gélben. 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk, majd gradiens (7,5-18 %) poliakrilamid gélen futtattunk.¹²⁹ A gélbe előzőleg 15 µg/ml egyfonalú csirkevér-DNS-t polimerizáltunk. A gél mérete 13 x 16 x 0,15 cm volt. A gélek futtatása egy éjszakán át, 7 mA/lap áramerősséggel, hűtőszekrényben történt. A futtatás után a gélek mosása, majd inkubálása M-Hamvas szerint történt.¹²⁵ A gélek futtatását követően, azokat 20 percen keresztül steril desztillált vízzel, majd 30 percen át 10 mM pH=7,5 Tris-HCl pufferrel mostuk. Az SDS eltávolítása végett, 20 % izopropil-alkoholt tartalmazó 10 mM pH=7,5 Tris-HCl pufferrel történő mosás következett (30 perc). A maradék izopropil-alkohol eltávolítása az inkubálásra használt pufferrel 2 x 15 perces mosással történt. Ezek után a géleket 4 °C-on az inkubációs pufferben pH=6,8-on, illetve pH=8,5-ön egy éjszakán át állni hagytuk, majd 37 °C-on 4 órán át inkubáltuk. A pH=6,8-on történő inkubáció során az enzimaktivitás növelése céljából az inkubáló pufferhez magnézium-ionokat (10 mM) adtunk. Az egy éjszakás állás hatására a fehérjék renaturálódtak. A gélek kiértékeléséhez etídiumbromidos (0,5-1,0 µg/ml) negatív festést alkalmaztunk.¹³⁰ 254 nm-es UV fénnyel megvilágítva az ssDN-ázok sötét sávként tűnnek elő az etidium-bromid okozta, narancssárga színű fluoreszcenciát mutató háttérben, a megemésztett ssDNS miatt.

M-Hamvas a mikrocisztinnel és a cilindrospermopszinnal végzett kísérletei alapján az alábbi mustár izoenzimeket tudta kimutatni:¹²⁵

A 90 kDa látszólagos molekulatömegű izoenzim: a mustár izoenzim pH optimuma 6,8-7,5, aktivitása a lúgos tartományban csökken, az izoenzim mind a kontrollban mind a CYN kezelt mintában kimutatható, az enzim valószínűleg a nukleázok "exonukleáz I" csoportjába tartozik.

Az 50 kDa látszólagos tömegű izoenzim: a mustár izoenzim pH optimuma 5,0, csak savas tartományban mutat aktivitást (pH: 4,0-6,0) magnézium-, kalcium- és mangán(II)-ionok (10 mM, 5 mM, 2,5 mM) hatására aktivitása a nem optimális pH-értékeken is megnő. Eddigi

kísérletek alapján úgy tűnik, hogy az etiolált növények gyökérzetében képződik. Aktivitása MC-LR kezelés hatására kismértekben megemelkedett.

A 30 kDa látszólagos molekulatömegű izoenzim: pH optimuma 6,5-7,5. Az eddigi adatok alapján, a mustár sziklevelében mutatja a legnagyobb aktivitást, molekulatömege harmada a 90 kDa-os látszólagos molekulatömegű izoenzimének, aktivitása azzal együtt, az SDS mennyiségének függvényében változik, az aktivitás MC-LR kezelés hatására megemelkedett. Az enzim valószínűleg a nukleázok "exonukleáz I" csoportjába tartozik.^{Hiba! A} könyvjelző nem létezik.

A 20 kDa látszólagos molekulatömegű izoenzim: pH-optimuma 8,0-8,5. Aktivitása a semleges és lúgos tartományban (pH=6,5-9,0) jelentős. Az etiolált növényekben nagyobb aktivitást mutat, mint a fény jelenlétében nevelteknél, a növényi szervek közül a mustár gyökerében mutatja a legnagyobb aktivitást, az aktivitás MC-LR kezelés hatására megemelkedett.

3.24. A proteázaktivitás vizsgálata gélelektroforézissel, cianotoxinokkal kezelt mustárnövényekből

A mustár proteázaktivitásának változását poliakrilamid gél elektroforézisével a Debreceni Egyetem Növénytani Tanszékének munkatársai már vizsgálták a M. aeruginosa és C. raciborskii cianobaktériumok által termelt cianotoxinok esetén. Megvizsgáltuk, hogy a C. raciborskii nyerskivonat, illetve a C. raciborskii szervezetből izolált új "cianotoxin" hogyan befolyásolja a mustár csíranövény proteáz izoenzimeinek aktivitását. Az általuk használt Schlereth és munkatársai által 2000-ben kifejlesztett módszer¹³¹ a Laemmli-féle gélrendszer¹²⁹ módosítása. A módosítás lényege, hogy a 10%-os poliakrilamid gélbe 0.04 %-os végkoncentrációjú zselatint polimerizáltunk, így lehetővé válik а proteázaktivitással rendelkező (elsősorban savas proteázok) fehérjék kimutatása. A vizsgálatokhoz 13 x 16 x 0,1 cm méretű gélrendszert alkalmaztunk. A mintákat "Cracking" puffer hozzáadása után, forralás nélkül, egyenlő térfogatúakra kiegészítve vittük fel a gélre. A felülrétegző gél összetétele megegyezett a fehérjemintázat meghatározásánál használt gélrendszer felülrétegző géljével, de nem tartalmazott zselatint. A gélelektroforézist 15 mA/lap erősségű egyenárammal, hűtőszekrényben végeztük. Az elektroforézist követően a gélt steril desztillált vízzel mostuk, majd az SDS-t 20 % izopropil-alkoholt tartalmazó 100 mM pH=8,0 Tris-HCl pufferrel, vagy 100 mM pH=5,0 NaH₂PO₄ pufferrel való 2 x 20 perces mosással távolítottuk el. Az inkubálás sötétben, 4-8 órán át a megfelelő mosópufferrel történt.

Ezután a géleket Comassie Brilliant Blue R-250 oldattal festettük, így a zselatint hasító fehérjék sávjai nem festődnek. Valamennyi gélen a látszólagos molekulatömeg meghatározásához molekulatömeg markert használtunk.

3.25. A környezeti hatások vizsgálata

Munkacsoportunk már korábban vizsgálta a cilindrospermopszint termelő *Aphanizomenon ovalisporum* esetén a cianotoxintermelés változását kén- és foszforlimitált körülmények között.¹¹³ Ezeket a vizsgálatokat a *C. raciborskii* (BGSD 266) szervezeten folyatattuk tovább.

A kísérletekhez 200 ml tápoldatot tartalmazó buborékoltatott tenyészeteket használtunk. A BG-NO₃ tápoldatban nevelt *C. raciborskii* tenyészetet centrifugálás után kén-, illetve foszformentes tápoldatokba oltottuk oly módon, hogy a tenyészetek induló optikai denzitása (A₈₀₀) mind az "éheztetett", mind a kontroll (Allen és BG-NO₃ tápoldat) tenyészetben közel azonos legyen. A már leírt módon a növekedésgörbékhez mintát vettünk, meghatároztuk a tenyészetek klorofill-a, fehérje- és szárazanyag-tartalmát, A₈₀₀ értékét valamint vékonyrétegkromatográfiás módszerrel az extrahálható cianotoxinok relatív mennyiségét. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy hogyan változik a tenyészet fehérjemintázata a kén-, illetve foszforlimitált környezet hatására. A foszfátmentes tápoldatokba dikálium-hidrogénfoszfát helyett azonos kálium-ekvivalens kálium-kloridot, magnézium-szulfát helyett magnéziumkloridot, vas(III)-szulfát helyett vas(III)-kloridot adtunk. A cink-szulfátot cink-nitrát, a réz(II)-szulfátot réz(II)-klorid helyettesítette a mikroelem oldatban.

3.26. A cianotoxinok izolálás a terepi mintákból

A 2001. évi kis-balatoni vízvirágzásokból származó és izolált *M. aeruginosa* cianotoxin tartalmát kívántuk meghatározni, jellemezni. Az összegyűjtött biomassza (sejtek centrifugálása, 9000 g, 20 perc) fagyasztásával és felolvasztásával feltártuk a sejteket, majd 4-szeres mennyiségű metanollal extraháltunk egy éjszakán át. A kapott szuszpenziót 4 °C-on, 8000 g-n centrifugáltuk 30 percen át, majd a felülúszót vákuumbepárlással töményítettük. Az így kapott maradékot DEAE-cellulóz oszlopon tisztítottuk. Az elúcióhoz 10 mM pH=7,5 Tris-HCl puffert és 0-0,1 M NaCl sógradienst használtunk. Ezután a sógrágienst 0,2 M NaCl koncentrációra emeltük és az oszlopon maradt komponenseket is eltávolítottuk. Az egyes frakciókat 240 nm-en fotometráltuk és mustárnövényteszttel vizsgáltuk toxicitásukat (200 µl

össztérfogatba 50 µl frakció + 20 µl steril desztillált víz + 100 µl 2 %-os agar, előcsíráztatott mustármag). A növényteszttel toxikusnak ítélt frakciókat C-18 Sep-Pack Plus tölteteken tisztítottunk tovább. A töltetek kondicionálása metanollal, majd 10 %-os metanollal történt. A toxinok lemosásához metanolt használtunk. Amennyiben szükséges volt a mintát Toyopearl (HW-40) molekulaszűrővel töltött oszlopon tisztítottuk tovább. Az oszlopról eluálódott frakciókból 200-200 µl-t bepároltunk 96-os Titertech-lemezen, majd a frakciók toxicitását mustárnövényteszttel vizsgáltuk (bepárolt frakció, 200 µl 1 %-os agar, előcsíráztatott mustármag). A toxikus frakciókat egyesítettük és A tisztítás utolsó lépéseként HPLC-s elválasztást alkalmaztunk. Szemipreparatív C-18-as kolonnát és acetonitril:víz:trifluorecetsav 30:70:0,07 eluenst használtunk a toxikus anyagok elválasztására 40 °C-on 3 ml/perc áramlási sebesség mellett. A toxicitást ismét növényteszttel detektáltuk. A toxikus frakciókat összepárlás után visszainjektáltuk a tisztaság ellenőrzése céljából . A megtisztított toxinokat tömegspektrumuk alapján azonosítottuk.

3.27. A pterokarpán és deuterált származékainak szintézise

A pterokarpán (**11a**) szintézisét a könnyen hozzáférhető szalicilaldehid-metiléterből (**1**) és 2-hidroxi-acetofenonból (**2**) kiindulva hat lépéses szintézissel valósítottuk meg. Első lépésben az **1** és **2** vegyületek lúgos kondenzációjával a **3** 2'-hidroxi-kalkont állítottuk elő, melynek tallium(III)-nitrátos oxidatív átrendeződési reakciója a **4** β -keto-aldehid-dimetilacetál származékhoz vezetett. E vegyületből savas kezeléssel jutottunk a Suginome és Iwadare¹³² által már leírt 2'-metoxi-izoflavonhoz (**5**). A szintézis következő lépésében a metil védőcsoportot alumínium-kloriddal vízmentes acetonitrilben hasítottuk le, a reakció a **6** 2'-hidroxi-izoflavont eredményezte (**7. ábra**).

6 nátrium-borohidrides redukciója a 7 alkohol *cisz-transz* keverékéhez vezetett, melyek gyűrűzárását vízmentes diklórmetánban bórtrifluorid-éteráttal valósítottuk meg, így kaptuk meg a **8** pterokarpánt (**7. ábra**).

A 6,6a,11a-trideutero-pterokarpán (**10**) előállítását a **6**-os izoflavonból kiindulva oldottuk meg. A redukciót deutero-borohidriddel vízmentes tetrahidrofurán és deuterometanol (CD₃OD) oldószerek elegyében végezve a **9** *cisz-transz* tetradeutero-izoflaván-4-ol származék keletkezett, melynek bórtrifluorid-éterátos gyűrűzárása a kívánt **10** trideutero-pterokarpánt szolgáltatta (**7. ábra**).



7. ábra 6, 8 és 10 előállítása

A részlegesen deuterált pterokarpánok szintézisét szintén 6-ból kiindulva oldottuk meg. A hidroxil-csoport átmeneti védelmére metoximetil-csoportot alkalmaztunk. Az ily módon védett 11 izoflavont lítium-alumínium-hidriddel, –50–60 °C-on a 12 izoflavanonná redukáltuk. 12-t deutero-borohidriddel deutero-metanolban redukálva kaptuk a 13 4-deutero-alkoholát *cisz-transz* keverékét, melyet bórtrifluorid-éteráttal kezelve jutottunk a 14 11a-deutero-pterokarpánhoz (8. ábra).



8. ábra 14 előállítása

A 6a-deutero-pterokarpán (18) szintézisét a 12-es 2'-metoximetil-izoflavanonból kiindulva oldottuk meg. A 12 izoflavanon 3-as hidrogénjét deutero-metanolból készített nátrium-alkoholáttal, a 15-ös enolformán át cseréltük ki deutériumra. Az így kapott 16 szokásos módon történő (NaBH₄, majd BF₃·Et₂O) átalakításával jutottunk a 18-as
célvegyülethez. **16**-ot felhasználva, annak deutero-borohidrides redukciója, majd BF₃·Et₂O-os gyűrűzárása szolgáltatta a **20** 6a,11a-dideutero-pterokarpánt (**9. ábra**).



9. ábra 18 és 20 előállítása

A 6-deutero-pterokarpán (25), 6,6a-dideutero-pterokarpán (26) és 6,11a-dideuteropterokarpán (28) előállítása 11-ből történt, mely vegyület kromongyűrűjének redukcióját deutero-LAH-hal hajtottuk végre, majd a dihidro-benzo[b]furán szerkezeti rész kialakítását a már előzőleg ismertetett módon végeztem el. Ezen reakciók összefoglalását tartalmazza a 10. ábra.



10. ábra A 26-hoz, 27-hez és 29-hez vezető szintézis

A vegyületek azonosítása NMR- és tömegspektrumuk alapján történt.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A *C. raciborskii* (BGSD 266) cianobaktérium laboratóriumi körülmények közötti nevelése

A laboratóriumi körülmények között nevelt tenyészetek növekedési görbéinek meghatározásához a következő adatokat vizsgáltuk: A_{800} , klorofill-a, fehérjetartalom, száraztömeg, toxicitás. Az A_{800} , fehérje- és a klorofill-a tartalomból kitűnik, hogy a lag fázis 3-4 napig tart, majd 2 hét elteltével a tenyészet átlép a stacioner fázisba. Az előkísérletek azt bizonyították, hogy ha a tenyészetet $A_{800}=0,2$ érték alá oltjuk, úgy olyan kevés sejt van a tenyészetben, hogy nem valósul meg a sejtek önárnyékolása, így nagyon nagy fénysokk éri a tenyészetet, a növekedés nem vagy csak igen lassan indul meg. A *C. raciborskii* nitrogénkötő cianobaktérium, amely a légköri nitrogént képes hasznosítani. A szervezet növekedését kötött nitrogént tartalmazó táptalajon (Allen + NaNO₃) és nitrogénkötő körülmények között (BG-NaNO₃ nélkül) követtük nyomon. Az adott körülmények között nem találtunk lényeges különbséget a növekedésben (az Allen tápoldatban a kiindulási A_{800} érték 6-szorosára, a BG tápoldatban 4-szeresére nőtt 12 nap alatt) (**11. ábra**).



11. ábra Az A₈₀₀ értékének változása a kötött nitrogént tartalmazó és nitrogénkötő tenyészetek esetén

A szárazanyagtartalom, fehérjetartalom és a klorofill-a tartalom változása is hasonló tendenciát mutat (**12.** és **13. ábra**).



12. ábra A klorofill-a tartalom változása a kötött nitrogént tartalmazó és nitrogénkötő tenyészetek esetén



13. ábra A szárazanyagtartalom változása a kötött nitrogént tartalmazó és nitrogénkötő tenyészetek esetén

Felfigyeltünk arra, hogy a kötött nitrogént tartalmazó tápoldatban a tenyészet fehérjetartalma 5-szörösére, a nitrogént kötő tenyészeté pedig 3-szorosára emelkedett (14. ábra).



14. ábra A fehérjetartalom változása a kötött nitrogént tartalmazó és nitrogénkötő tenyészetek esetén

A különbség magyarázata az lehet, hogy a nitrogént kötő tenyészet növekedési rátája kisebb a kötött nitrogént hasznosító tenyészeténél. Ez utóbbi különbség láthatóan nem mutatkozik meg a fényszórás alapján mért növekedési rátákban.



15. ábra A toxicitás változása a kötött nitrogént tartalmazó és nitrogénkötő tenyészetek esetén

A **15. ábrán** a csíranövények hosszát tüntettük fel az idő függvényében. Az egyre kisebb növényhossz a toxicitás mértékének növekedését jelenti.

A toxicitási adatokat figyelve elmondható, hogy az Allen tápoldatban nevelt tenyészet végig toxikusabb, mint a nitrátmentes tápoldatban nevelt, tekintettel arra, hogy a toxicitási görbe a növekedési görbe inverze. Mint azt láttuk, az kötött nitrogént tartalmazó tápoldatban nagyobb a cianobaktérium sejtek mennyisége. Az adatok alapján elmondható, hogy a tenyészetben lévő sejtmennyiség és a toxicitás között lineáris összefüggés van. Az IC₅₀ érték hypokotyl esetén (a kezdeti hypokotyl hosszhoz viszonyítva) Allen médium esetén a 4,5-ik napra míg a nitrátmentes médiumban az 5,5-ik napra adódott. Az IC₅₀ érték gyökér esetén (a kezdeti gyökérhosszhoz viszonyítva) Allen médium esetén a 4. napra, nitrátmentes médiumban a 7. napra adódott. Mint látható, a gyökér érzékenyebben reagál a toxikus anyagcseretermékekre, mint a hypokotyl. A növény teljes egészét nézve nem találtunk morfológiai elváltozásokat, pl. nekrotikus foltokat.

A 250 ml-es buborékoltatott tenyészettel folytatott kísérleteket követően meghatároztuk az 5 literes tömegtenyészet neveléséhez szükséges optimális körülményeket. Kísérleteink azt mutatták, hogy az 5 literes tenyészeteket legcélszerűbb 1 liter exponenciális növekedésű, nitrogénkötő tenyészetekkel beoltani. Az előbbi körülmények között a tenyészet 800 nm-en mért fényabszorpciója 0,2-nek adódott. A tenyészet "önárnyékolása", az inokulum nagysága lehetővé teszi a cianobaktérium eredményes növekedését a kötött nitrogént tartalmazó tápoldaton. Kipróbáltuk a 10 literes tenyészeteket is az izolációhoz szükséges biomassza előállításához, de ez a méretű edény nem biztosította az ideális fényviszonyokat a növekedéshez, a sejtek szaporodása igen lassú volt.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy a Balatonból izolált *C. raciborskii* (BGSD 266) törzs buborékoltatott tenyészetben történő neveléséhez minimum A=0,2-es értékű 800 nm-en mért kezdő optikai denzitás szükséges. A tenyészet Allen tápoldatban 2 hét alatt éri el a késő exponenciális / korai stacioner fázist (A₈₀₀=0,7-0,8), centrifugálással 7-8 gramm nedves sejttömeg nyerhető. Megfigyeltük ugyanis, hogy ha tovább hagyjuk a tenyészeteket növekedni, a fonalak eltöredeznek. A nitrátmentes táptalaj – mivel csak a nitrogénkötésre képes szervezetek növekedését teszi lehetővé – ideális a törzsfenntartásra, illetve a izoláláshoz szükséges inokulum elkészítésére. A biomassza előállítására az kötött nitrogént tartalamzó Allen tápoldat alkalmasabb, mivel gyorsabban és nagyobb tömegben szaporodnak benne a cianobaktérium sejtek, ráadásul BG-NO₃ tápoldatban a tenyészetek több, mint 3 hét alatt (25 nap) érik el az exponenciális fázist és az izolálható cianotoxin mennyisége is kevesebb.

4.2. A cianotoxinok izolációja

A Növénytani Tanszék munkatársai tömegspektrometriai, HPLC-s, valamint kapilláris elektroforézis mérések segítségével folytatott kísérletekkel bebizonyították, hogy a *C. raciborskii* törzs nem termeli a cilindrospermopszin nevű cianotoxint. A mustár csíranövényekkel folytatott kísérletekben azonban az erősen toxikusnak mutatkozott.¹²³ A megállapítás meglepő, mert az irodalmi adatok, a fajmeghatározás (Komárek, személyes közlés) arról tanúskodik, hogy a szóban forgó szervezet azonos az Ausztráliában talált cilindrospermopszint termelő szervezettel. Ezek után felmerült az az alapvető kérdés, milyen anyagcseretermékek felelősek a tesztnövényre kifejtett növekedésgátló hatásért. Erre a kérdésre a toxikus anyagcseretermék(ek) izolálásával és szerkezetük meghatározásával kívántuk megadni a választ.

A többlépcsős izolálás során több toxikus frakciót is sikerült elkülöníteni. A tisztítási műveletet a legtoxikusabbnak ítélt frakciókkal folytattuk tovább. A toxicitási tesztekhez a már ismertetett mustár csíranövény tesztet használtuk. A toxikus anyag izolációjánál 40 g biomasszából indultunk ki, melyet az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon

feltártunk és metanollal extraháltuk. A metanol által kicsapott anyag, mustár csíranövény teszttel nem mutatott toxicitást. A metanolos felülúszót vákuumrotációs bepárlón 35 °C-on bepároltuk, az így kapott toxikus anyagot tartalmazó maradékot DEAE anioncserélő oszlopon tisztítottuk a már leírt módon (**16. ábra**).



16. ábra A toxikus cianobakteriális extraktum DEAE cellulóz oszlopon történő elválasztása

A DEAE anioncserélő oszlopról eluálódó, növényinhibítor aktivitású toxikus frakciókat (**16. ábra**, 53-70 frakciók, az ábrán nyíllal jelölve) Toyopearl HW-40 molekulaszűrő oszlopon tisztítottuk tovább, ami nem csak a további tisztítást, hanem a sómentesítést is szolgálta. A toxicitás meghatározására mustár csíranövény tesztet használtunk. Axenikus rendszerben dolgozunk, így feltételezhetjük, hogy a gátlás csak a toxin hatásából adódik. A Toyopearl oszloppal már jól elkülönülő csúcsokat kaptunk. Ott kaptuk a legnagyobb gátlást, ahol a 210 nm-en mért fényelnyelés a legnagyobb volt (**17. ábra**).



17. ábra A DEAE cellulózos tisztítás toxikus frakcióinak tisztítása Toyopearl molekulaszűrőn

Toxikusnak a 47-53-ig terjedő frakciók (az ábrán nyíllal jelölve) bizonyultak; ezeket HPLC-vel tisztítottunk tovább. A tisztítás hatékonyságának növelése érdekében a szerves kémiai szintézistermékek tisztításánál használatos szilikagéloszlopot vezettük be, amely a megfelelő eluensek használatával alkalmasnak bizonyult a tisztítás hatékonyságának növelésére. Miután a keresett, ismeretlen anyag már a kezünkben volt, a tisztítást nyomon tudtuk követni vékonyrétegkromatográfiás módszerrel is; ez azonban nem jelentette a mustár csíranövényteszt, mint toxicitást jelző próba elhagyását. Amint az a **18. ábrából** is jól látható, az alkalmazott szilikagéloszlopon történő tisztításnál a szennyező- és színanyagok a kromatogram elején jelennek meg, míg a végén, elkülönülve található a vizsgálni kívánt komponens (79-212 frakciók, a **18. ábrán** nyíllal jelölve).



18. ábra A cianobakteriális extraktum szilikagél oszlopon történő tisztítása

Ezt a frakciók vékonyrétegkromatográfiás vizsgálata is alátámasztotta (19. ábra).



19. ábra A szilikagéles tisztítással kapott frakciók vékonyrétegkromatogrammja

Ez a tisztítási módszer kis mennyiségeknél olyan hatékonynak bizonyult, hogy a toxikus frakciók közvetlenül HPLC-rendszerrel tisztíthatóak voltak. Nagyobb mennyiség esetén azonban szükségessé vált a molekulaszűrős Toyopearl tisztítás.



20. ábra Szilikagéles oszloppal előtisztított termék Toyopearl kromatográfiája

A vizsgálatok során itt is alkalmaztuk a frakciók vékonyrétegkromatográfiás vizsgálatát (21. ábra).



21. ábra A szilikagéles oszlop utáni Toyopearl molekulaszűrős tisztítás frakcióinak vékonyrétegkromatogrammja 254 és 365 nm-es fényben

A toxikus frakciókat összegyűjtöttük és HPLC-vel tisztítottuk tovább. A tisztított anyagot visszainjektáltuk, azért, hogy lássuk a tisztítás hatékonyságát. Egy tipikus, tisztítás előtti és utáni HPLC-kromatogramm látható a **22. ábrán**.



22. ábra A cianotoxin HPLC-kromatogrammja tisztítás előtt és után Összegzésként elmondhatjuk, hogy a *C. raciborskii* tenyészetből sikerült egy növényi inhibítor metabolitot izolálni, az izoláláshoz szilikagél- és Toyopearl-oszlopot valamint utolsó lépésként szemipreparatív HPLC-t alkalmaztunk.

4.3. A tisztított, cianobakteriális ismeretlen metabolit szerkezetazonosítása

A már korábban leírt módon megtisztított toxikus anyag szerkezetének felderítéséhez a következő módszereket használtuk: NMR-, IR-, UV-spektroszkópia, tömegspektrometria és molekulamodellezés. Az egyes módszerekkel párhuzamosan dolgozva, a **23. ábra** szerinti séma alapján jutottunk el az izolált toxikus metabolit szerkezetéhez.



23. ábra A szerkezetazonosítás folyamatának sémája

4.4. A nominális molekulatömeg meghatározása

A tisztítás során kapott mintát a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén működő MALDI tömegspektrométeren megmértük és m/z 436 Da-nál valamint m/z 452 Da-nál kaptunk csúcsot. Először arra voltunk kíváncsiak, hogy az m/z 436-os csúcs nátrium addukt-e (M+Na⁺). Az addukt típusának eldöntésére irányuló kísérleteket a MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometriai laboratóriumban végeztük ESI-Q₃ készüléken. Hasonlóan a MALDI technikához, ennél az ionizációs módszernél is protonált vagy nátrium-addukt formájában jelennek meg a molekulaionok. Az addukt típusának eldöntése céljából a minta egy kis részéhez kálium-, illetve lítiumvegyületet adtunk (KCl, illetve LiCl).

Ennek hatására az előző spektrumhoz képest 420 Da-nál $(M+Li^+)$ és 452 $(M+K^+)$ Da-nál jelentek meg további csúcsok, melyek bizonyítják, hogy a molekulatömeg 413 Da. (**24. ábra**)



24. ábra Az izolált cianotoxin tömegspektruma a kálium-, ill. lítiumvegyület hozzáadása előtt és után

További bizonyíték arra, hogy a 452 Da-os csúcs kálium-addukt az is, hogy az MS-MS kísérletben 30 eV ütközési energiánál megjelenik és 40 eV ütközési energia hatására jelentősen megnő a kálium-ion intenzitása. (**25. ábra**)



25. ábra A 452 Da-os kálium-addukt MS-MS spektruma 30 és 40 eV ütközési energiánál

Azt, hogy egyszeresen töltött ionokról van szó az támasztja alá, hogy mindegyik esetben az izotópcsúcsok közötti különbség 1 Da volt (**2. táblázat**).

Izotóp-	Csúcs (Da)							
eloszlás	M+Li ⁺	M+Na ⁺	$M+K^+$					
mind ¹² C	420,1	436,1	452,1					
1db ¹³ C	421,1	437,1	453,1					
2db ¹³ C	-	438,1	454,1					

2. táblázat A lítium-, nátrium- és kálium-adduktok izotópcsúcsai

4.5. A pontos tömeg és az összegképlet meghatározása

A pontos tömegméréseket egy ESI-Q-TOF készüléken végeztük pozitív módban, kalibrálással. Az izolált toxikus anyagcseretermék esetén mind a nátrium-adduktnak mind a protonált csúcsnak egymástól függetlenül meghatároztuk a pontos tömegét, amely megadja az addukt elemi összetételét (**3. táblázat**).

3. táblázat A protonált molekula és a nátrium-addukt tömegei és összegképletük

	Összegképlet	Mért érték (Da)	Elméleti érték (Da)	ppm eltérés
$Molekula + H^+$	$C_{16}H_{24}O_8N_5$	414,1617	414,1625	-1,93
Molekula + Na ⁺	C ₁₆ H ₂₃ O ₈ N ₅ Na	436,1448	436,1444	0,92

Az izolált toxikus metabolit összegképlete tehát a következő: C₁₆H₂₃O₈N₅.

4.6. Az NMR módszerekkel kapott eredmények és értékelésük

A tömegspketrometriai mérésekkel párhuzamosan NMR méréseket is folytattunk, ezen két méréstechnika adta a szerkezetkutatatás alapkövét. Az NMR méréseket a Debreceni Egyetem (Bruker DRX-500 spektrométer) NMR laboratóriumában végeztük. Az NMR polarizáció átviteli módszerek segítségével meghatároztuk az atomok szomszédosságát a kémiai kötések mentén. A csatolási hálót COSY, TOCSY (ⁿJ_{HH}, n =2-5) és HSQC (ⁿJ_{CH}, n=1) és HMBC (ⁿJ_{CH}, n=2-5) kétdimenziós NMR technikákkal térképeztük fel. Elvileg ezek az információk elegendőek lehetnek az ismeretlen molekula konstitúciójának megállapítására. Azonban –amint a vizsgálatok előrehaladtával kiderült – a viszonylag kisszámú hidrogén miatt az egymáshoz közeli (0.16–0.5 nm) protonok térközelségének 2D NOESY módszerrel történő megállapítása is elengedhetetlen volt a szerkezeti javaslathoz.

4.6.1. Egydimenziós NMR-spektrumok (¹H, ¹³C) spektrumok kiértékelése

Először a ¹H-NMR és a ¹³C-HMR spektrumokat vettük fel. Ezen spektrumok alapján elmondható, hogy a molekulában 15 db nem cserélhető hidrogénatom van (azaz olyan hidrogénatom, amely szénatomhoz kapcsolódik).

A ¹³C-izotóp kis gyakorisága miatta a ¹³C-spektrumok felvétele hosszabb időt, illetve nagyobb mintamennyiséget igényel. Mivel a mintamennyiség kicsi volt, a spektrumokban az eleve kis intenzitással jelentkező kvaterner szénatomok intenzitása nagyon kicsi. A J-modulált ¹³C-spektrum információt szolgáltat a szénatomok rendűségéről (azaz a hozzájuk kapcsolódó hidrogének számáról). Az ilyen típusú spektrumban – megegyezés szerint – a páratlan számú hidrogént viselő szénatomok (primer és tercier) jele az alapvonal felett, míg a páros számú hidrogént viselő szénatomoké (szekunder) és a kvaternereké az alatt jelentkezik. A molekulában lévő szénatomok közül 10 páratlan és 6 páros rendűségű.

A gondos tisztítási folyamatok ellenére is maradhatnak kis mennyiségben jelenlévő szennyezők a mintában. Így például – egyebek mellett – állandó szennyezőként jelentkezik az etanol és a trifluor-ecetsav (TFA). Ezeket a tisztítás utolsó lépésében használjuk és többszöri liofilizálás után sem távolíthatók el nyomtalanul, ezért jeleik – általában kisebb intenzitással – az NMR-spektrumokban megjelennek.

4.6.2. A kétdimenziós NMR-spektrumok kiértékelése

4.6.2.1. A HSQC-spektrumok kiértékelése

Az egydimenziós spektrumok után a mintáról HSQC felvételeket készítettünk azért, hogy megállapítsuk mely szénatomhoz mely hidrogének tartoznak.

A spektrumok alapján 11 szénatomhoz kapcsolódik hidrogénatom. A nehézvizes, illetve dimetil-szulfoxidos spektrumok alapján a következő kémiai eltolódásokat észleltük (4. táblázat):

	Eltolódás D ₂ O-ban (ppm)												
¹³ C	14.36	56.52	60.42	64.49	67.54	70.80	73.82	75.70	79.24	94.59	148.56		
¹ H	1.34	3.33	3.26 3.19	3.81	3.69	2.11	4.17	4.96	3.68	4.93	8.85		
				Eltoló	lás d ₆ -D	MSO-b	an (ppn	n)					
¹³ C	15.3	56.70	61.88	64.98	67.96	71.41	73.47	76.12	80.43	95.75	149.09		
$^{1}\mathrm{H}$	1.20	3.38	3.10 3.29	3.68	3.75	2.62	4.02	4.67	2.95	4.75	8.85		

4. táblázat ¹³C és ¹H eltolódások a HSQC-mérések alapján, D₂O-ban és d₆-DMSO-ban

Mint látható, a d₆-DMSO-ban felvett spektrum ppm értékei kismértékben eltérnek a nehézvízben felvett értékektől. Az NMR spektrumok alapján az alábbi, **26. ábrán** látható részszerkezetet tudtuk felírni.



26. ábra Az NMR spektrumok alapján megállapított részszerkezet

A

5. táblázat összegfoglalólag tartalmazza a részszerkezetre vonatkozó NMR-adatokat.

				D ₂ O		d ₆ -D	MSO
Atom	Rendű- ség	Csoport	¹ H kémiai eltolódás [ppm]	¹³ C kémiai eltolódás [ppm]	Csatolási állandó [Hz]	¹ H kémiai eltolódás [ppm]	¹³ C kémiai eltolódás [ppm]
1	Т	СН	4,94	94,59	$J_{1,2} = 4,0$	4,75	95,75
2	Т	СН	3,69	67,54	$J_{2,3} = 10,3$	3,75	67,96
3	Т	СН	3,08	79,24	$J_{3,4} = 3,0$	2,95	80,43
4	Т	СН	3,82	64,59	$J_{4,5}\!\sim 0$	3,68	64,98
5	Т	СН	2,11	70,80	$J_{5,6a} = 5,7$	2,62	71,41
6a, 6b	S	CH ₂	3,26 3,19	60,42	$J_{5,6b} = 7,0 \\ J_{6a,6b} = 11,1$	3,10-3,29	61,88
7	Р	CH ₃	3,34	56,52	_	3,38	56,71
8	Т	СН	4,17	73,82	$J_{8,9} = 6,2$ $J_{8,10} = 2,1$	4,02	73,47
9	Р	CH ₃	1,34	14,36	J _{8,9} =6,2	1,2	15,31
10	Т	СН	4,96	75,70	$J_{8,10} = 2,1$	4,67	76,12
		P = p	rimer, $S = szel$	kunder, $T = ter$	cier, $Q = kvate$	erner	

5. táblázat A felírt részszerkezet NMR adatai

A H-1 proton csak a H-2 protonnal csatol, emiatt H-1 jele dublettként jelentkezik a spektrumban; a mért csatolási állandó $J_{1-2} = 4$ Hz. Ebből az értékből következik, hogy a H-1 és H-2 hidrogénatomok egymással kis diéderes szöget zárnak be. A H-2 jele dupla-dublett, $J_{2-3} = 10,3$ Hz, tehát a H-2 és H-3 atomok által bezárt diéderes szög nagy, vagyis azok transzdiaxiális helyzetben vannak. $J_{3-4} = 3$ Hz, így a 3-as és 4-es hidrogének közötti diéderes szög kicsi. $J_{4-5} \sim 0$ Hz, tehát a H-4-es H-5 diéderes szög is kicsi, vagyis H-4 ekvatoriális állású. H-5 csatol a H-6_a, H-6_b és a CH₂ protonokkal is. A csatolási állandók: $J_{5-6b} = 7, J_{5-6a} = 5,7$ Hz. A 6_a és 6_b hidrogének egymással is csatolnak, a csatolási állandó $J_{6a-6b} = 11,1$ Hz, ez az érték jellemző a geminális helyzetű protonokra. A 7-es metoxi-csoport jele szingulett. A 8-as szénatomhoz kapcsolódó hidrogén csatol a 9-es metil-csoport hidrogénjeivel és a 10-es protonnal, a csatolási állandók: $J_{8-9} = 6,2$ Hz és $J_{8-10} = 2,1$ Hz. Az utóbbi kis érték, ezért feltételezhetjük azt, hogy a 8-as és 10-es szénatomokon lévő protonok kis diéderes szöget zárnak be egymással, azaz a relatív térhelyzetük *cisz*. A 9-es helyzetben metil-csoport található, melynek protonjai csatolnak a H-8-as hidrogénnel. A 10-es szénatomon lévő proton kizárólag csak a 8-as szénatomon lévővel csatol, ezért a szerkezetfelderítésnél azt feltételeztük, hogy a 10-es szénatomhoz egy heteroatom, vagy egy kvaterner szénatom kapcsolódik.

Az ¹H-NMR spektrumban található jelek kémiai eltolódásai, integrálértékei és felhasadásai alapján egy monoszacharid-vázat sejtetnek. A vázprotonok csatolási állandói α -D-galaktopiranozid egységre engednek következtetni, amely torzítatlan ⁴C₁ szék konformációban található. Az α -anomer konfigurácót megerősíti a mért nagy, ¹J_{C1,H1} = 170 Hz csatolási állandó is.

A ¹³C-NMR spektrumok alapján a következők mondhatók el: az összegképlet meghatározásánál azt találtuk, hogy a szénatomszám 16, amelyből 10 található a feltüntetett részszerkezeten. A ¹³C-NMR spektrumban ezen szenek a

5. táblázatban feltüntetett kémiai eltolódásoknál adnak jelet. A spektrumban a 6-os szénatom jele "lefelé", míg az 1-es, 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös, 7-es, 8-as, 9-es és 10-es szénatomoké "felfelé" mutatnak.

4.6.2.2. A TOCSY spektrumok kiértékelése

Mint azt már az "Anyagok és módszerek" részben említettük, kovalens kötésen keresztül homonukleáris korreláció jöhet létre (COSY, TOCSY). A COSY csak a spin-párok közt ténylegesen működő spin-spin csatolás esetén ad jelet, azaz elsősorban 2-3 kötés távolságban. A TOCSY további mágnesezettség átvitellel a teljes spinrendszereket egy kísérletben igazolhatja. Tekintettel arra, hogy a COSY spektrumokban manifesztálódó skaláris csatolások általában jól észlelhetők a TOCSY spektrumokban is, ezért a COSY spektrumban lévő csatolásokat nem ismertetem külön.

A TOCSY spektrumokat is mindkét oldószerben felvettük annak a reményében, hogy a cserélhető protonok által generált csatolásokat is nyomon tudjuk követni. Mivel nagyon kevés anyag állt rendelkezésünkre és a minta nagyon higroszkópos volt, ilyen jellegű csatolásokat a vízzel való csere miatt nem vagy csak egy-egy spektrumban találtunk, így meglétük megkérdőjelezhető.

H	H1 H2 H3		3	H4		H5	5	H6a,	H6a,b		[7	H8		Н9		H10			
а	b	а	b	а	b	а	b	а	b	А	b	a	b	а	b	а	b	а	b
H2	3	H1	3	H2	3	H3	3	H6a	3	H6a,b	2	-	-	H9	3	H8	3	H8	3
H3	4	H3	3	H4	3	H2	4	H6b	3	H5	3	-	-	H10	3	H10	4	H10	4
H4	5	H4	4	H1	4	H1	5	H4	3	H4	4	-	-						
H5	4					H6a,b	4	H1	4			-	-						
	a: csatoló proton sorszáma; b: a csatoló protonok közötti kötéstávolság																		

6. táblázat Proton-proton csatolási háló a TOCSY mérések alapján

Mivel a táblázatban minden csatolás kétszer szerepel, proton-proton csatolásról lévén szó a jobb áttekinthetőség kedvéért a következőkben kötéstávolság szerinti sorrendben tárgyalom az egymással csatoló hidrogéneket.

Kétkötéses konnektivitások:



Kétkötéses geminális csatolás van a 6a és a 6b hidrogének között. (Ez a csatolás megtalálható a COSY spektrumban is).

Háromkötéses konnektivitások:



Mint az ábrán is látható, háromkötéses (vicinális) csatolás van a H1-H2, H2-H3, H3-H4, H4-H5, H5-H6, H8-H9 és H8-H10 protonok között. (Ezen csatolások megtalálhatóak a COSY spektrumban is). A jelek megléte nem függ az alkalmazott oldószer minőségétől. Négykötéses konnektivitások:



Négy kötésen keresztül ható konnektivitás van a H1-H3, H1-H5, H2-H4, H4-H6a,b valamint a H9-H10 protonok között.

Ötkötéses konnektivitások:



Ötkötéses *konnektivitás* van a H1 és a H4 hidrogének között.

Ezen adatok alapján elmondható, hogy a cukorrész egy spinrendszert alkot, a másik spinrendszer a cukorhoz kapcsolódó oldallánc. Fontos megjegyezni, hogy a 3-as szénatomhoz kapcsolódó metoxi-csoport az éterkötésű oxigén miatt megszakítja a spinrendszert, így a C7-es szénatomhoz kapcsolódó hidrogének nem tagjai a cukor spinrendszerének. Ugyanilyen éterkötésű oxigén választja el egymástól az oldallánc spinrendszerét a cukor spinrendszerétől.

4.6.2.3. A HMBC-spektrumok kiértékelése

A cukorrész szerkezetének alátámasztása céljából olyan NMR-kísérleteket végeztünk, amelyek a többkötéses proton-szén csatolásokról adnak felvilágosítást.

A HMBC kísérlet itt alkalmazott változata (lecsatolt, gradienses változat, egyszeres aluláteresztő szűrővel) általában jól elnyomja az egykötéses konnektivitást, melyeket egyébként a HSQC spektrumból kapunk meg. A spektrumok felvételét mind nehézvízben (D₂O), mind d₆-DMSO-ban elvégeztük. A molekulában lévő cserélhető hidrogének (–NH–, –NH₂, –OH) jelei ugyanis csak a d₆-DMSO-ban készült felvételekben jelennek meg, mivel D₂O-ban ezen hidrogének deutériumra cserélődnek. Így a nehézvízben felvett proton-NMR

spektrumból megismerhetjük a nem cserélhető protonok számát és környezetét. Az összegképletben szereplő hidrogénatomok számának és a nehézvizes kísérletben kapott hidrogénatomok számának különbsége tehát a cserélhető hidrogének számát adja meg.

A kapott eredmények összegzését táblázatos formában tüntettük fel (7. táblázat). A magyarázathoz a jobb áttekintés céljából ábrákat alkalmaztunk. Az adatokból egyértelműen kiderül, hogy az alapváz egy hattagú cukor, melyhez az anomer hidroxil-csoporton keresztül egy propil-oldallánc kapcsolódik. A kapcsolódás a propil-rész kettes szénatomján keresztül jön létre.

H-	1	H-2	2	H-	3	H-	4	H-	5	H-	6	H-	7	Н-8	3	Н-9)	H-1	0
a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	а	b	а	b	а	b
C3	3	C1	2	C2	2	C3	2	C4	2	C5	2	C3	3	C1	3	C8	2	C8	2
C5	3	C3	2	C4	2	C2	3	C6	2	C4	3	C4	4			C10	3	C1	4
C8	3	C16	3	C7	3	C6	3	C1	3	C1	4	C5	5						
C2	2	C4	3	C3	1			C7	5			C7	1						
				C5	4														
	•	a: c	sato	ló szé	énate	om so	rszá	ma;	b: a	a csato	oló a	atomo	k kö	özötti k	ötés	távolsá	ıg		

7. táblázat Proton-szén csatolási háló a HMBC mérések alapján

Az egyes protonok csatolásainak ismertetése előtt szeretném megjegyezni, hogy különböző paraméterekkel és oldószerekben több mérést is végeztünk, az ábrákon és a 7. táblázatban csak azokat a csatolásokat tüntettem fel, melyeket legalább két mérés igazolt.

Megjegyzendő, hogy 4-5 kötéses *proton-proton* csatolások előfordulnak csak telített kötéseket tartalmazó szénhidrátokban is. Hasonló, *heteronukleáris* távolható csatolások szintén előfordulhatnak (bár erre kevesebb irodalmi példa van), azonban jelenlétük mindig egy merev, rögzített konformációra utal (pl. W alakú elrendeződés).



Az 1-es számú szénatomon lévő hidrogén csatol a tőle két kötéstávolságra lévő 2-es, valamint a tőle három kötéstávolságra lévő 3-as, 5-ös és 8-as szénatommal. Utóbbi csatolás perdöntő.





A 2-es szénatomon lévő hidrogén csatol a tőle két kötéstávolságra lévő 1-es és 3-as, valamint a három kötéstávolságra lévő 4-es szénatommal.

A 3-as szénatomhoz kapcsolódó hidrogén csatol saját szénatomjával, a tőle két 4-es kötéstávolságra lévő 2-es és szénatomhoz, továbbá a három kötésre lévő metoxi-szénatommal. Ez utóbbi 7-es kölcsönhatás bizonyíték arra, hogy a cukor 3-as helyzetében hidroxil-csoport helyett O-metil csoportot találunk. Találhatunk még egy gyenge négykötéses csatolást is az 5-ös szánatommal.



A 4-es szénatomhoz kapcsolódó hidrogén csatol a tőle két kötésre lévő 3-as szénatommal. További, három kötésen keresztüli csatolások jelentkeznek a 2-es és 6-os szénatommal.



Az 5-ös proton csatol a tőle 2 kötéstávolságra lévő 4-es és 6-os szénatommal, továbbá találunk még háromkötéses csatolást C1-hez, valamint egy ötkötéses csatolást C7-hez.





A 6-os számú szénatomon két hidrogén van, mindkettő csatol a velük két kötéstávolságra lévő 5-ös, a három kötéstávolságra lévő 4-es és a négy kötéstávolságra lévő 1-es szénatommal.

A 7-es szénatomon lévő metoxi-hidrogének csatolnak a tőlük három kötéstávolságra lévő 3-as szénatommal és a négy kötéstávolságra lévő C4-gyel, ezenkívül két spektrumban megtaláltuk az öt kötéstávolságra lévő C5-tel történő csatolást is. Megtalálhatjuk még a saját szénatommal történő egykötéses csatolást is. A 3-as, illetve 4-es szenekkel történő csatolás igazolja a metoxi-csoport jelenlétét.



A 8-as szénatomon lévő hidrogén a három kötéstávolságra lévő 1-es szénatommal ad jelet.



A 9-es metil-szénatomon lévő hidrogének kétkötéses csatolásban vannak a 8-as, háromkötéses csatolásban a 10-es szénatommal.



A 10-es szénatomon lévő hidrogén teremt kapcsolatot a cukorrész és az aglikon között: jelet ad a két kötésnyi távolságra lévő 8-as és a négy kötéstávolságra lévő 1-es szénatommal.

Az eddigi eredmények alátámasztják a cukoregység glikozidos hidroxil-csoportja és az aglikon heterogyűrűje közötti oldallánc meglétét.

4.6.2.4. A NOESY-spektrumok kiértékelése

Amint arról már szó volt ("Anyagok és módszerek" fejezet), a hidrogének egymással nem csak kötéseken keresztül (COSY, TOCSY), hanem téren keresztül is képesek kölcsönhatni (NOE, Nuclear Overhauser Effect). Ezért ez a vizsgálati módszer alkalmas lehet a molekula térszerkezetének megjósolására. A molekula térszerkezetére a röntgendiffrakciós vizsgálatok szolgáltatnának pontos adatokat, de az ehhez szükséges egykristály növesztése esetünkben nem volt lehetséges, egyrészt az anyag kis mennyisége, másrészt higroszkópos tulajdonsága miatt.

A NOESY spektrumokat nehézvízben vettük fel. A kapott eredményeket a 8. táblázat tartalmazza.

H1	H2	Н3	H4	H5	H6a,b	H7	H8	H9	H10
H2	H1	H2	H7	H6a,b	H6a,b	H3	H9	H1	H9
H9	H3	H4	H3	H4	H4	H4	H10	H9	H8
H8		H5	H5	H3	H5		H5	H10	H1
H5		H7	H6a,b	H1			H1	H15	
				H9					

8. táblázat Térbeli csatolási háló a NOESY mérések alapján



A baloldali ábrán az 1-es szénatomhoz kapcsolódó anomerproton téren át ható csatolásait jelöltem be. Látható, hogy csatolást találunk a 2-es hidrogénnel; ez további bizonyítéka annak, hogy a cukorrész alfa helyzetű oldalláncon keresztül kapcsolódik az aglikonhoz. A 8-as és 9-es hidrogénekkel való csatolás az ezen oldalláncon keresztül történő kapcsolatot támasztja alá.



A 2-es hidrogén csatol az 1-es és 3-as szénatomon lévőkkel.



A 3-as szénatomhoz kapcsolódó proton csatol a már említett 2-es hidrogénnel. Az axiális helyzet miatt kézenfekvő az 5-ös és 4-es szénatomokon lévő hidrogénekkel való csatolás.





OН



hidrogén helyzetéből 5-ös számos Az hidrogénnel van csatolásban. Csatol a már említett 1-es, 3-as és 4-es hidrogénekkel. Természetesen csatol a 6-os szénatom metilén-hidrogénjeivel is. Gyenge csatolást találtunk továbbá az oldallánc metilhidrogénjeivel. Ezen csatolás erőssége azonban elhanyagolható a többihez képest, így azt feltételeztük, hogy a távolság 5Å-nél nagyobb is lehet.



A 6-os szénatomon lévő hidrogének a már említett 4-es 5-ös hidrogénekkel történő csatoláson kívül természetesen egymással is csatolnak.



A 7-es szénatomon lévő hidrogének csatolnak a már említett 3-as és 4-es hidrogénekkel.



Természetszerű a 8-as proton 9-es és 10-es protonokkal való térközelsége. Az 1-es és 5-ös hidrogénekkel történő csatolás perdöntő: mindkettő a cukorváz és az oldallánc térközelségére utal. Valószínűsítik egy merev struktúra létét. ugyanis flexibilisen kapcsolódó propil-csoport esetén (szabad C1-C8 rotáció) H-8–H-5 а kapcsolat kizárható.



A 9-es metil-csoport hidrogénjei a már említetteken kívül (1-es és 8-as szénatom hidrogénje) csatolnak a 10-es szénatomon lévő hidrogénnel.



Az oldallánc utolsó szénatomja a 10-es szénatom, melynek protonja csatol a már említett 1-es és 9-es szénatomokkal.

A NOE-mérések eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy a metil-csoport NOE kölcsönhatásaiból annak az anomer protonhoz képest elfoglalt térhelyzetére lehet következtetni. Az itt bemutatott elemzéssel bizonyítottuk, hogy az izolált toxikus metabolit egy *galaktóz*-származék.

4.6.3. A cserélhető hidrogének számának meghatározása (hidrogén-deutérium csere)

A deuterálási kísérletek célja az volt, hogy igazoljuk azon elképzelésünket, miszerint az általunk izolált cianotoxinban 6 cserélhető hidrogén van, és meghatározzuk ezen protonok

számát a cukorrészben, illetve az aglikonban. Ehhez a nehézvízben felvett mintákat mértük meg az ESI-Q₃ készülékkel. A kísérletet elvégezve egy nyolc tagból álló csúcssorozatot (414 \rightarrow 421) kaptunk a 414 Da-os és egy hét tagból álló csúcssorozatot (436 \rightarrow 442) az m/z 436 Da-os ion esetén (**27. ábra**)



27. ábra A nehézvízben oldott cianotoxin tömegspektruma

Az NMR adatokkal összevetve ez azt jelenti, hogy a molekulában összesen 6 db cserélhető hidrogén van –OH, –NH–, –NH₂ formában. Ha megnézzük a molekula eddigi részszerkezetét láthatjuk, hogy a cukorrész két hidroxil-csoportja már szubsztituált, azaz maximum három cserélhető hidrogén lehet a cukorrészen. Ha ez így van, akkor a maradék három cserélhető hidrogénnek az eddig még nem ismert aglikon részen kell lennie. Ha az aglikonrész viszont nem csak az anomeres hidroxil-csoporton keresztül kapcsolódik a cukoregységhez, hanem van egy visszakapcsolódás is, akkor a cukor részen már csak kettő cserélhető hidrogén lesz. Ez azt jelenti, hogy az aglikonon a cserélhető hidrogének száma négy. A visszakapcsolódás kérdésének eldöntése céljából MS-MS felvételeket készítettünk. Előkísérleteinkben megfigyeltük, hogy a nem deuterált anyag esetén az m/z 414-es ion MS-MS spektrumában megjelent az m/z 238-as és az m/z 220-as ion (**28. ábra**).



28. ábra A m/z 414-es ion MS/MS spektruma

Feltételezzük, hogy a molekulaion cukorvesztésével jön létre a 238-as ion, továbbá hogy az ebből történő vízvesztéssel az m/z 220-as ion. Az m/z 220-as ion, amely ilyen formán az aglikon rész protonált formája, megfelelőnek bizonyult a deuterálási kísérletekben. A deuterált minta spektrumából az m/z 419-es ion választottuk ki az aglikon vizsgálatára. Az m/z 419-es ion esetén 5 deutérium található a molekulaionban a cserélhető hidrogének helyén. Így ha ebből az 5 deutériumból 4 az aglikonon található, akkor m/z 225-ös ion megjelenése várható.



29. ábra Az m/z 419-es ion MS/MS spektrumának részlete

Az m/z 419-es ion MS-MS felvétele azt a feltevést támasztotta alá, hogy az aglikon két helyen kapcsolódik vissza a cukorrészhez, ugyanis egy 6 tagból álló csúcssorozatot kaptunk: 220, 221, 222, 223, 224 és 225 Da-nál (**29. ábra**). Ez csak úgy képzelhető el, ha magán az aglikonon van 4 cserélhető proton. Ez viszont azt jelenti, hogy a cukorrészen csak két cserélhető hidrogén van. Ebből az következik, hogy az aglikon két helyen kapcsolódik a cukoregységhez, amit a már meglévő NMR eredmények alapján is valószínűsítettünk.

4.6.4. Az NMR és MS mérésekből következő részeredmények

Eddigi eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy a toxikus anyagcseretermék egy 3-*O*-metil-galaktóz származék, melynek anomeres hidroxil-csoportja egy izopropilcsoporthoz kapcsolódik. Ezen izopropil-csoport a 10-es sorszámú szénatomján (metil-csoport, sp³ hibridizációjú szénatom) keresztül kapcsolódik a molekula aglikonrészéhez. A kapcsolódás heteroatomon, vagy kvaterner szénatomon keresztül történik, a 10-es szénatom másik vegyértékével is egy heteroatomhoz, vagy egy kvaterner szénatomhoz kapcsolódik. A molekula további részleteinek tisztázásához felhasználtuk az MS-MS fragmentáció adatait, illetve az infravörös spektrumból levont következtetéseket.

4.6.5. A molekula aglikonrészének szerkezetfelderítése

A molekula további részének kiderítése céljából az összegképlet alapján meghatároztuk a molekulában található kettőskötések és gyűrűk együttes számát az $a - \frac{1}{2}b + \frac{1}{2}c + 1$ képlet segítségével, mely egy adott C_aH_bN_cO_d összegképletű molekulára alkalmazható. A gyűrűk és kettőskötések számára 8-at kaptunk. A cukorváz és az aglikon visszakapcsolódása miatt 6 darab kettőskötés és gyűrű található az aglikon részben. A nitrogénatomok nagy száma és gyűrűkre és kettőskötésekre kapott relatíve (a szénatomok számához viszonyítva) nagy érték miatt valószínűnek tűnik, hogy az aglikon egy heteroaromás vegyület.

A molekula összegképletéből következik, hogy az aglikon $C_6H_5N_5O_2$ összegképletű, ebből 4 hidrogén cserélhető (OH, NH₂, NH) formában van jelen. Egy hidrogénatom szénatomhoz kapcsolódik. Ehhez a szén-hidrogén kapcsolathoz egy ~ 8,8 ppm-es ¹H-eltolódás és egy ~ 148 ppm-es ¹³C-eltolódás rendelhető. A proton eltolódás értékéből nyilvánvaló, hogy ez a CH-csoport egy hiperkonjugált, vagy egy aromás rendszer része. A szénatomon lévő hidrogén kémiai eltolódása feltételezi egy heteroaromás rendszerben való részvételét, jelének szingulett volta pedig azt, hogy közelében nem található olyan szénatom, melyhez hidrogénatom kapcsolódik. Tehát feltételezhető, hogy a szóban forgó szénatom (148 ppm) heteroatomhoz vagy kvaterner szénatomhoz kapcsolódik. Az aglikonban lévő többi szénatom nem hordoz protont (a HSQC spektrumban nem adnak jelet). Egydimenziós ¹³C-spektrumban nagy, 100 ppm feletti eltolódással rendelkeznek, ez sp² hibridizációjú szénatomokra utal. Ez a hibridizációs állapot aromás, illetve konjugált rendszerekre jellemző.

A toxikus anyagcseretermékről felvett HMBC spektrum alapján a következő, **30. ábrán** jelzett észrevételeket tehetjük az aglikonnal kapcsolatban:



30. ábra A cukor rész kapcsolata (csatolásai) az aglikonnal, a HMBC mérés alapján

A galaktózegységhez kapcsolódó izopropil-csoport 8-as hidrogénje jelet ad a 128-as szénatommal (*zöld* nyíl), így ez a két atom maximum 4 kötés távolságra lehet. Az izopropilcsoport 10-es szénatomja jelet ad a 145-ös, 148-as és 152-es szénatomokkal (*kék* nyilak), így ezek a szénatomok is maximum 4 kötés távolságra lehetnek a 10-es hidrogéntől; ez az jelenti, hogy a 10-es szénatomtól három kötés távolságra négy másik szénatomnak kell lennie. A 148-as szénatom hidrogénje jelet ad a 128-as, 144-es és 152-es szénatommal (*rózsaszín* nyilak), ezért feltételezhető, hogy ezen szénatomok maximum 4 kötés távolságra vannak a hidrogénatomtól. A cukorrész 2-es szénatomjának hidrogénje csatol a 168-as szénatommal (*piros* nyíl). Ez további bizonyíték arra, hogy az aglikonnak két kapcsolódási pontja van a cukorrésszel. A csatolás ténye valamint az, hogy a szén eltolódásértéke ilyen nagy arra enged következtetni, hogy ez a szénatom (2-es) közvetlenül kapcsolódik a 2-es helyzetű hidroxil-csoporthoz, illetve kettőskötéssel (sp²-hibridizáció miatt) nagy valószínűséggel nitrogén-vagy oxigénatomhoz kapcsolódik.

A TOCSY spektrumban csatolást találunk a 10-es proton és a 148 ppm eltolódású szénatomhoz kapcsolódó hidrogén (8,85 ppm) között (**31. ábra**).



31. ábra A 10-es proton csatolása az aglikon ismeretlen részével a TOCSY spektrum alapján

A NOESY spektrumok elemzése során a következő megállapításokat tettünk: a 148 ppm eltolódású szénatomon lévő hidrogén csatol a 3-as, 5-ös, 8-as, 9-es és 10-es szénatomon lévő hidrogénekkel. (**32. ábra**)



32. ábra Térbeli csatolások a NOESY spektrumok alapján

A jelintenzitásokból megállapítható, hogy a 3-as, 8-as és 10-es hidrogénatomok közötti csatolás erősebb, azaz ezek a hidrogének közelebb helyezkednek el a 148 ppm eltolódású szénatomon lévő hidrogénekhez, mint a 5-ös hidrogén. A 9-es hidrogénekkel történő csatolás ugyan kimutatható, de szinte elhanyagolhatóan kicsi. Ezek a csatolások arra engednek következtetni, hogy ez a 148 ppm eltolódású CH-csoport a cukorvázhoz közel található.

4.7. Az infravörös spektrum értelmezése

Az IR spektrum felvételénél problémát okozott az anyag higroszkópos tulajdonsága (emiatt a KBr-tabletta bemattult), amit már korábban is tapasztaltunk, hiszen liofilizálás után szobahőmérsékleten képlékennyé vált. A kapott spektrum (**33. ábra**) alapján a következő észrevételeket tettük. A 3500 cm⁻¹ értéknél jelentkező széles sáv a molekulában lévő hidroxil-, illetve amino-csoportokra utal, az 1800-1600 cm⁻¹ érték között lévő széles dupla sáv alátámasztja a heteroaromás rendszer feltételezését, mivel nagy valószínűséggel a v(C=C), v(C=O), v(C=N), továbbá az amidok jellegzetes sávja is itt található. Az 1500 cm⁻¹-nél található jelek az aromás váz jellemző vegyértékrezgései, az 1412 cm⁻¹ értéknél lévő sáv alátámasztja a hidroxil-, illetve amino-csoportok meglétét (β (OH), β_{as} (NH₂)). Az 1204 cm⁻¹-nél jelentkező sáv éterkötésben lévő oxigénre utal, (μ_{as} (C-O-C)), míg az 1150 cm⁻¹-es sáv a metoxi-csoport meglétét támasztja alá (v(O-C-OCH₃)). Az 1000 cm⁻¹ értéknél lévő erős sáv

ismételt bizonyítéka a hidroxil-csoport jelenlétének (μ (C-OH)), a 840 cm⁻¹ értéknél jelentkező sáv a CH-csoportra jellemző.



33. ábra A tisztított cianotoxin infravörös spektruma

Összefoglalásként elmondható, hogy a molekula aglikonrészében egy többszörösen szubsztituált heteroaromás gyűrű található, amelyhez egy amid funkciós csoport, illetve egy guanidino-csoport kapcsolódik. A molekulában nagy valószínűséggel amino-csoport található.

4.8. Az MS-MS spektrumokból levont következtetések

Az ESI-Q-TOF készülék lehetővé tette, hogy nem csak a molekulaion, hanem a fragmens ionok tömegét is nagy pontossággal megmérjük.

A fragmensek pontos tömegének meghatározására két lehetőségünk nyílt. Amennyiben az adott fragmension látható volt az eredeti, azaz nem MS-MS spektrumban, a fragmension közelében kalibrálva megkaptuk annak pontos tömegét. Ezt a módszer választottuk a nagy intenzitással megjelenő 238-as, illetve 220-as ion esetében. A másik lehetőség az volt, hogy a kiválasztott iont (414, 238, 220) fragmentálásakor olyan ütközési energiát választunk, ahol még látható az anyaion a spektrumban. Ezeknél a spektrumoknál az anyaionra, mint ismert pontos tömegű ionra kalibráltunk. A pontos tömegek és így a pontos tömegvesztések ismeretére azért van szükség, mert így különbséget tudunk tenni például egy hidroxil-csoport,

illetve egy ammóniamolekula vesztése között, amit nem tehetnék meg alacsony felbontású készüléknél, mivel mindkettő nominális tömege 17 Da. A **28. ábra** (4.6.3. fejezet) a toxikus metabolit MS-MS spektrumát mutatja, a **9. táblázat** pedig a jellegzetes fragmenseket tartalmazza.

Mért tömeg [Da]	Számított tömeg [Da]	Összegképlet	ppm eltérés
414,1625	414,1617	$C_{16}H_{24}O_8N_5$	1,9
238,0927	238,0940	$C_9H_{12}N_5O_3$	-1,3
220,0835	220,0834	$C_9H_{10}N_5O_2$	0,5
203,0578	203,0570	$C_9H_7N_4O_2$	3,9
202,0730	202,0729	C ₉ H ₈ N ₅ O	0,5
194,0681	194,0679	$C_7H_8N_5O_2$	1,0
193,0789	193,0726	$C_8H_9N_4O_2$	3,3
192,0883	192,0887	$C_8H_{10}N_5O$	-2,1
178,0728	178,0729	$C_7H_8N_5O$	-0,6

9. táblázat Az m/z 414-es ion fragmensei

Ha a molekulaion összegképletéből kivonjuk az m/z 238-as ionnak megfelelő összegképletet láthatjuk, hogy helyes volt azon elképzelésük, hogy a molekulaionból ez az ion a cukorrész semleges molekulaként történő távozásával jön létre. Az m/z 238-as ion MS-MS spektrumában megtalálható az m/z 220-as ion, amely az m/z 238-as ionból vízvesztéssel jön létre. Az m/z 220-as ion MS-MS spektrumában (**34. ábra**) a **9. táblázat**ban szereplő ionok jelentek meg.



34. ábra Az m/z 220-as ion MS/MS spektruma

Ezen ionok a 35. ábrán látható neutrális vesztések során jönnek létre:



35. ábra Az m/z 220-as ion neutrális vesztései

Mint azt már említettem, a 238-as ionban még megtalálható a cukormolekula egyik hidroxil-csoportja, így a 220-as ion mondható az aglikon protonált formájának. Ez a protonált forma ammóniát képes veszíteni, ami feltételezi az amino-csoport jelenlétét. A 220-as ionból történő vízvesztés csak úgy képzelhető el, ha az aglikonban található egy hidroxil-csoport. Az acetilénvesztés az izopropil-oldalláncból vagy a heteroaromás gyűrűből történhet. A hidrogén-cianid vesztés történhet a heteroaromás gyűrűből, illetve olyan oldalláncból, ami a cukorváz távozásával válik szabaddá, valószínűleg a 2-es hidroxil-csoporthoz kapcsolódva. Annak a valószínűsége, hogy a molekula maga ciano-csoportot tartalmaz kicsi, mivel az IR spektumban 2200 cm⁻¹ értéknél nem találtunk jelet. Az m/z 220-as ion szén-monoxid vesztése karbonil-csoport jelenétét feltételezi.

Összefoglalva elmondható, hogy az aglikonrész karbonil-, hidroxil- és amino-csoportot tartalmaz, és egy nitrogéntartalmú oldalláncon keresztül kapcsolódik vissza a cukorrészhez.

4.9. Az UV-spektrum értelmezése

Az abszorbancia-maximumok 214, 238, 275 és 347 nm-nél találhatók, ezek aromás amidra jellemzők (**36. ábra**).

1, 274	Hullámhossz [nm]	Abszorbancia (c = 0,1 mg/ml)	Abszorpciós koefficiens
A	214	0,998	$4,12 \times 10^3$
	238	0,988	$4,12 \times 10^3$
	275	1,274	5,03 x 10 ³
0,000 200,0 300,0 400,0 512,9	347	0,552	$2,57 \times 10^3$

36. ábra A cianotoxin UV-spektruma, valamint abszorbancia-maximumai 4.10. A cianotoxin szerkezetének felírása

A fentebb ismertetett adatok birtokában a toxikus anyagcseretermék szerkezetére javaslatot tettünk. A feltételezett szerkezetet molekuladinamikai módszerekkel vizsgálva a cianotoxin térbeli szerkezetére is tettünk javaslatot (**37. ábra**). A kvantumkémiai számítások részletes ismertetése nem képezi a dolgozat tárgyát.



37. ábra Az izolált cianotoxin szerkezete

A vegyület kémiai neve:

4-amino-5,10-dihidroxi-9-(hidroximetil)-13-imino-11-metoxi-6-metil-5,6,7a,9,10,11,11a,13oktahidropirano[2,3-*j*]pirimido[4,5-*e*][1,9,3]dioxaazacikloundecin-2(3*H*)-on. A vegyületnek a *cilindrospermopsziciklin* (CYC) triviális nevet adtuk.

4.11. Az aglikonra vonatkozó NMR adatok értelmezése

Az aglikon eddig még nem ismertetett atomjainak ¹H- és ¹³C-NMR eltolódás értékeit a 10. táblázat

10. táblázat tartalmazza.

		D	$_{2}O$	d ₆ -D	MSO
Atom	Rendűség	¹ H kémiai eltolódás [ppm]	¹³ C kémiai eltolódás [ppm]	¹ H kémiai eltolódás [ppm]	¹³ C kémiai eltolódás [ppm]
10 (OH)	-	-	-	3,5	-
11	Q	-	128,04	-	128,18
12	Q	-	154,63	-	154,20
12 (NH ₂)	-	-	-	6,4	-
13	Q	-	154,93	-	154,73
14	Q	-	152,81	-	152,24
15	Т	8,91	148,56	8,78	149,09
16	Q	-	164,88	-	169,81
16 (NH)	-	-	-	3,7	-

10. táblázat Az aglikon NMR adatai

4.11.1. A HMBC spektrum értelmezése



A 8-as szénatomon lévő hidrogén az eddig ismertetetteken kívül a 11-es szénatommal ad jelet.



A 10-es szénatomon lévő hidrogén teremt kapcsolatot a cukorrész és az aglikon között: jelet ad az aglikonrészben található 12-es és 14-es (három kötéstávolság), valamint a 15-ös (négy kötéstávolság) szénatomokkal. Ezzel is bizonyított a cukor-aglikon kovalens kapcsolat.

Az előbbiekben igazolt aglikonrészben az egyetlen nem cserélhető hidrogén a 15-ös szénatomon található, ez a hidrogén csak az aglikon szénatomjaival van csatolásban: kétkötéses csatolást mutat a 14-es, háromkötésest a 11-es és négykötésest a 13-as szénatommal.

A DMSO-ban feloldott minta HMBC és TOCSY spektrumának részletes tanulmányozásakor két cserélhető proton hetero- és homonukleáris csatolásaira is figyelmesek lettünk (**38. ábra**), ezzel a 10-es szénatom hidroxil-csoportjának és a 16-os szénatomhoz kapcsolódó nitrogénatom hidrogénjeinek cserélhető mivoltát tudtuk igazolni. A heterogyűrűben lévő –NH–, valamint az –NH₂ hidrogének igazolását az nehezíti, hogy ezen protonok jelei gyakran diffúzak (így pl. nehezen integrálhatók), s ehhez a jelenséghez esetünkben még a tautoméria is hozzájárulhat.



38. ábra Két cserélhető proton csatolásai a HMBC és TOCSY mérések alapján (d₆-DMSO)
4.11.2. A NOESY spektrum értelmezése

Tekintettel arra, hogy a NOESY spektrumban is "megfordítható" kapcsolatokról beszélünk, a jellemző csatolásokat összefoglalva, a 15-ös szénatomon lévő hidrogén esetén ismertetjük (**39. ábra**).



39. ábra Térbeli csatolások a NOESY spektrum alapján

A 15-ös szénatomon lévő hidrogénatom kapcsolatot mutat a cukorváz és a molekula többi részének protonjaival. A NOE kölcsönhatások igazolják azt, hogy a 15-ös hidrogén a cukorrészhez térben is közel helyezkedik el. Ha megnézzük a jelek intenzitását azt állapíthatjuk meg, hogy minden egyes jel intenzitása nagyobb, mint a 15-ös proton 9-es protonnal való kölcsönhatásának intenzitása. Ezen csatolás gyengesége 5 Å-nél nagyobb átlagos távolságot feltételez, így feltételezhető, hogy az oldallánc és a heterogyűrű által kialakított gyűrűben a 10-es hidrogén befelé (erős csatolás a 15-ös szénatomon lévő hidrogénnel), míg a metil-csoport abból kifelé néz. A 15-ös és 3-as szénatomokon található hidrogének egymással való intenzív csatolása bizonyítja azon elképzelésünket, hogy az aglikon a cukorváz alatt helyezkedik el, viszont nem fordul teljesen alá, mivel a 5-ös hidrogénnel való csatolása gyengébb mint a 3-as hidrogénnel létrejövő csatolás.

Összefoglalva: az NMR-adatok alátámasztották az általuk felírt szerkezeti képletet, és segítségükkel megjósoltuk a molekula térbeli szerkezetét is. A kapott eredmények a térszerkezetre vonatkozó kvantumkémiai számításokkal összhangban voltak.

4.12. A fragmentációs útvonalak

A dolgozat ezen részében az általunk felírt lehetséges szerkezet fragmentációját kívánjuk bemutatni. A **40.** és **41. ábrákon** látható az m/z 414-es molekulaion MS/MS spektruma.



40. ábra Az m/z 414-es ion MS/MS spektruma (185-300 Da tartomány)



41. ábra Az m/z 414-es ion MS/MS spektruma (30-185 Da tartomány)

Az m/z 238-as ion képződése

A molekulaion kötései a tömegspektrométer ionforrásában vagy ütközési cellájában elhasadnak oly módon, hogy a molekula cukorrésze semleges molekulaként távozik és egy pozitív töltésű aglikonrész marad vissza. A töltés egy többlet proton miatt jön létre, ami bármely heteroatomhoz kapcsolódhat, ezért a molekula mellett tüntettük fel. Ezt az ábrázolást kívánjuk alkalmazni minden olyan esetben, amikor az ion egy semleges molekula

protonálódásával jön létre. Az így keletkező m/z 238-as ionra három féle szerkezet írható fel, ezeket 238a, 238b és 238c-vel jelöltük (**42. ábra**).



42. ábra Az m/z 238-as ion képződése

Az m/z 220-as ion képződése

Az m/z 238-as ionból vízvesztéssel jön létre az m/z 220-as ion. Az m/z 220-as ionok lehetséges szerkezetét a **43. ábra** mutatja be. Az m/z 238 ionban két hidroxil-csoport is van, ezek bármelyike távozhat vízként.



43. ábra Az m/z 220-as ionok lehetséges szerkezetei

Mint az az ábrán is látható, csupán az m/z 220-as ionra 11 különböző szerkezet írható fel. Ha megnézzük ezen ionok szerkezetét, akkor kézenfekvőnek látszik ammónia [M-17], víz [M-18], acetilén [M-26], hidrogén-cianid [M-27], szén-monoxid [M-28] és etilénvesztése [M-28]. (Az etilén- és szén-monoxid vesztés egyaránt 28 tömegegységgel csökkenti a fragmens ion tömegét, a két lehetséges út között a nagypontosságú tömegmérés képes különbséget tenni). A jellegzetes fragmentációs útvonalakat a legelső fragmens nominális tömegének megfelelő sorrendben ismertetjük.

Az m/z 203-as ion fragmentációja

Az első fragmentációs útvonal az m/z 203-as ionnal kezdődik. Ez az ion az m/z 220-as ionból történő ammóniavesztéssel jön létre (**44. ábra**).



44. ábra Az m/z 203-as ion keletkezése és fragmentációja

Az m/z 220-as ion ammóniavesztésével a heterogyűrűn egy pozitív töltés jön létre, amely egy kettőskötés kialakulásával és többlettöltés protonkét történő megjelenésével stabilizálódik. Az m/z 203-as ion vízvesztés után eredményezi a m/z 185-ös iont. Az m/z 185-ös ion hidrogén-cianid vesztés után (m/z 158) szén-monoxidot (m/z 130), majd acetilént veszít (m/z 104).

Az m/z 203-as ion nem csak vizet, hanem szén-monoxidot is veszthet, így jön létre az m/z 175-ös ion. Ebből az ionból képződik az m/z 149-es és az m/z 147-es ion. Az m/z 149-es ion acetilénvesztéssel jön létre, míg az m/z 147-es ion egy átrendeződést követő szén-monoxid vesztéssel. Az m/z 149 ion szerkezetéből követik, hogy megvalósulhat belőle egy szén-monoxid, illetve egy hidrogén-cianid vesztés, míg az m/z 147-es ion hidrogén-cianid és acetilénvesztéssel fragmentálódik tovább. A dolgozat további részében szereplő fragmentációs utak során más szerkezetű, de ugyanilyen összegképletű m/z 149-es és m/z 147-es ionok is bemutatásra kerülnek. Ezen ionok fragmentációját tekintettel arra, hogy a fentebb feltüntetett csoportokat veszíthetik el, részletesen nem mutatjuk be.



45. ábra Az m/z 203-as ion fragmentációja

Az m/z 202-es ion fragmentációja

Az m/z 220-as ionból ammóniavesztésen kívül vízvesztés is történhet, ami az m/z 202-as iont eredményezi. Ez az ion ammóniakilépés után adja a már ismert m/z 185-ös iont, melynek további fragmentációját már ismertettem.



46. ábra Az m/z 202-es ion keletkezése és fragmentációja

A 202-es ion hidrogén-cianid elimináció után adja az m/z 175-ös iont, amely ammóniát, szén-monoxidot, acetilént, valamint propint tud veszíteni, így kapjuk rendre az m/z 158, 149, 147 és 135-ös ionokat. Az m/z 158-as ion szén-monoxidot veszítve adja az m/z 130-as iont, amelyből hidrogén-cianid távozásával jön létre az m/z 103-as ion.

Az m/z 147-es ion az oldallánc teljes vesztésével adja az m/z 107-es iont. Ugyanezt a iont kapjuk meg akkor is, ha az m/z 202-es formából képződő m/z 175-ös ion először veszíti

el az oldalláncot (m/z 135), majd szén-monoxidot. Az m/z 175-ös ionban olyan az oldallánc szerkezete, hogy történhet az acetilénvesztés is.

Az m/z 202-es ion szén-monoxid vesztésével jön létre az m/z 174-es ion, mely lehetséges vesztései a következők: az oldallánc vesztése, ammóniavesztés, valamint hidrogéncianid vesztés (**47. ábra**).



47. ábra Az m/z 174-es ion keletkezése és fragmentációja

Az m/z 194-es ion fragmentációja

Az m/z 220-as ion következő lehetséges vesztése az acetilénvesztés, ami viszont csak az "a" formából valósulhat meg. Így jön létre az m/z 194-es ion amely további fragmentációját mutatja be a **48. ábra**.



48. ábra Az m/z 194-es ion keletkezése és fragmentációja

Mint látható, az m/z 194-es ionból történhet vízvesztés, (így jön létre az m/z 176-os ion), illetve szén-monoxid vesztés, (így jön létre az m/z 166-os ion). Amennyiben az m/z 176-os ion hidrogén-cianidot, vagy az m/z 166-os ion ammóniát veszít, ugyanazon összegképletű, de eltérő szerkezetű m/z 149-es ion jön létre.

Az m/z 193-as ion fragmentációja

Az m/z 220-as ion lehetséges vesztése a hidrogén-cianid vesztés, ami minden olyan 220-as ion formából megvalósulhat ahol a molekula 2-es hidroxil csoportjának oxigénje és a 16-os szén atom közötti kötés heterolitikus hasadásával jön létre a 238-as ion.az m/z 193-as ionra jellemző hidrogén-cianid vesztést követő szén-monoxid elimináció (m/z 193). Az így létrejövő ion metán molekula kilépéssel eredményezi az m/z 149-es iont (**49. ábra**)



49. ábra Az m/z 193-as ion keletkezése és fragmentációja

Mint az **49. ábra** mutatja, az m/z 220e ion két helyről is eliminálhat szén-monoxidot: vagy a heterogyűrűből vagy az oldalláncról. Az így létrejövő m/z 165-es ion metánt veszítve adja az m/z 149-es iont. Ugyanehhez az ionhoz jutunk, ha heterogyűrűből történő szén-monoxid vesztést követően az oldallánc acetonmolekulaként távozik.

Az m/z 192-es ion fragmentációja

Az m/z 192-es ion a m/z 220-as ionból képződik szén-monoxid vesztés során. Mint az az m/z 220-as ion szerkezetekből kitűnik, az említett szén-monoxid vesztés a heterogyűrűből valósulhat meg. Amennyiben az ion (220-as) keto formában felírható, akkor az oldalláncból is történhet szén-monoxid vesztés. Az m/z 192-es ion lehetséges vesztései a következők: ammónia, acetilén, hidrogén-cianid és formaldehid. Ammóniavesztés során jön létre az m/z 175-ös ion, amely szén-monoxid vesztés után adja a már ismert m/z 147-es iont (**50. ábra**).



50. ábra Az m/z 192-es ion keletkezése és ammóniavesztése

Amennyiben az m/z 220-as anyaion az oldalláncon tartalmazott acetilénvéget, akkor lehetőség van az ammóniavesztést követő szén-monoxid vesztés mellett acetilénvesztésre is. Ezt mutatja be a **51. ábra**.



51. ábra Az m/z 220a ion fragmentációja

Acetilénvesztés akkor valósulhat meg, ha a 220-as ion tartalmaz az oldallánc végén acetilén részt. Ennek a kritériumnak a 220a, 220f és 220h szerkezetek felelnek meg. Az acetilénvesztést a 220a szerkezet példáján mutatom be (**52. ábra**):



52. ábra Az m/z 192-es ion acetilénvesztése

Mint a fenti ábrán látható, az m/z 192-es ionból acetilénvesztés során jön létre az m/z 166-os ion. Ez az ion ammóniát eliminálhat, így jön létre az m/z 149-es ion.

Az m/z 192-es ionok minden olyan esetben képesek hidrogén-cianid eliminációra amikor az anyaionként szereplő m/z 220-as ion ciano-csoportot tartalmaz.



53. ábra Az m/z 192-es ionból történő HCN-elimicáció

Mint azt a **53. ábra** mutatja, az m/z 192-es ion hidrogén-cianid vesztése az m/z 165-ös iont eredményezi. Ez az ion tovább fragmentálódhat úgy, hogy metán lép ki belőle, így az m/z 149-es fragmenst kapjuk. Érdekes megjegyezni, hogy amennyiben a m/z 192-es ion úgy jön létre, hogy a 220-as ion heterogyűrűjéből lép ki a szén-monoxid akkor az így keletkezett m/z 192-es ion hidrogén-cianid vesztést követő propionaldehid eliminációjával adja az m/z 109-es iont.

Az m/z 192-es ionból történhet formamidvesztés is abban az esetben, ha az m/z 192-es ion anyaionja úgy jön létre, hogy a molekulaion fragmentációja során a cukorváz 2-es hidroxilcsoport oxigénje és a 2-es szénatom közötti kötés hasad heterolitikusan.



54. ábra Formamidvesztés az m/z 192-es fragmensből

Az m/z 177-es és m/z 178-as ionok fragmentációja

Az m/z 177-es ion az m/z 220i-ből képződik gyökvesztéssel. Az m/z 178-as ion is a m/z220i ionból képződik, amikor az oldallánc egy része lehasad, az így létrejövő m/z 178-as ion ammóniát, hidrogén-cianidot és szén-monoxidot tud veszíteni. Ammóniavesztés során jön létre az m/z 161-es ion ami szén-monoxidot veszít (m/z 133). Ez az ion hidrogén-cianid molekula veszést követően adja a m/z 106-os iont. Az m/z 178-as ion másik lehetséges vesztése a hidrogén-cianid vesztés. Ekkor keletkezik az m/z 151-es ion ami szén-monoxid elimináció után adja az m/z 123-as iont (**55. ábra**).



55. ábra Az m/z 177-es és 178-as ionok keletkezése és fragmentációja

Az m/z 220-as ion acetaldehidvesztése

Az m/z 220-as ionból történhet acetaldehidvesztés abban az esetben, ha a 220-as ion oldallánca tartalmaz acetaldehid egységet. Ilyen oldalláncal találkozhatunk az m/z 220e forma esetén (ennek a formának a tautomerjei az m/z 220c és 220i formák).



56. ábra Az m/z 220-as ion acetaldehidvesztése

Az m/z 220-as ion formamidvesztése

Formamidvesztés során jön létre az m/z 175-ös ion ami szén-monoxid vesztés után adja az m/z 147-es iont (**57. ábra**).



57. ábra Az m/z 220f ionból történő formamidvesztés

Összegzésként elmondható, hogy ezen fragmentációs utak egyértelműen alátámasztották az általunk felírt szerkezetet.

4.13. Az izolált metabolit (cilindrospermopsziciklin) biológiai hatásainak előzetes analízise

A C. raciborskii cianobaktérium nyers kivonatának hatása a mustár csíranövényre

Az izolált toxikus cianobakteriális anyagcseretermék hatásának vizsgálatához mustár csíranövényeket használtunk. Minden tisztított cianotoxinnal végzett kísérlet előtt az "Anyagok és módszerek" fejezetben már leírt módon előkísérleteket végeztünk a C. raciborskii szervezet nyerskivonatával, mivel a tiszta cianotoxin előállítása nemcsak drága, de nagyon időigényes folyamat is. Mivel axenikus mustárrendszerben dolgoztunk, a gátlóhatást csak a tápanyagba (agarba) adott nyerskivonat, vagy tiszta toxin okozhatja. A kísérletekhez etiolált növényeket használtunk, mivel sötétben a hypokotyl hirtelen megnyúlása miatt a növekedésgátlás szembetűnőbb és ezzel egyidejűleg az IC₅₀ érték pontosabb meghatározására nyílik lehetőség. A növénytesztkísérletekhez 1-3 mm gyököcskével rendelkező, előcsíráztatott mustármagokat használtunk, így feltételezhető volt, hogy a főgyökér által felvett és a hypokotyl által továbbított cianotoxin hatását tanulmányoztuk, de nem volt kizárható a maghéjon keresztül történő cianotoxin felvétel sem. A nyerskivonat, illetve a tisztított cianotoxin csírázásra gyakorolt hatását azonban nem vizsgáltuk, azaz nem végeztünk olyan kísérletet amikor a nyerskivonatot vagy a tisztított cianotoxint tartalmazó táptalajra még csírázásnak nem indult mustármagot helyezünk. Az előcsíráztatott mustármagokat a különböző koncentrációban nyerskivonatot tartalmazó agarra helyeztük (10 db mustárnövény/koncentráció/nap), ezután 2, 3 és 4 nap elteltével mintát vettünk. Lemértük a mustárnövény tengelyszerveinek hosszát és nedvestömegét. Nulla időpontnak az ültetés időpontját tekintettük, viszont az agarra helyezett magok tömegének és hosszértékeinek hiányában nem rendeltünk hozzájuk adatokat. Az első mintavételi időpontban (2. nap) a kontrollnövények átlagos hypoktylhossza 24 mm, míg gyökérhossza 18 mm volt, az IC₅₀ érték 800 µg/ml-nek adódott. A két legnagyobb koncentráció esetén számos magba zárt növényt találtunk. A következő ábrákon (58., 59., 60. és 61.) a koncentrációadat a liofilizált biomassza (C. raciborskii) végső koncentrációját jelenti a tápagarban.



58. ábra A nyers cianobakteriális kivonattal kezelt 2 napos mustárnövény tengelyszerveinek hosszadatai

A három napos kontrollnövények elérték az átlagos 38 mm hypokotyl és 25 mm gyökérhosszat, az IC₅₀ érték 800-1600 μ g/ml közé esett (**59. ábra**).



59. ábra A nyers cianobakteriális kivonattal kezelt 3 napos mustárnövény tengelyszerveinek hosszadatai

A 4 napos kontrollnövények esetén a hypokotylhossz 56 mm-nek, míg az átlagos gyökérhossz 28 mm-nek adódott. A hosszadatokban nagymértékű ugrás figyelhető meg a 1600-3000 μ g/ml-es tartományban, ahol az IC₅₀-érték is található (**60. ábra**).



60. ábra A nyers cianobakteriális kivonattal kezelt 4 napos mustárnövény tengelyszerveinek hosszadatai

Ezek az eredmények összhangban vannak az M-Hamvas által kapott adatokkal,¹²⁵ aki a 4 napos növények esetén az IC₅₀ értéket 2 mg/ml-nek mérte. Érdekes megjegyezni, hogy a mikrocisztinnel ellentétben alacsony koncentrációknál tapasztaltunk nem növekedésserkentést, továbbá megfigyeltük, hogy az idő teltével a toxicitás mértéke csökken. Ez a csökkenés nem egyedülálló jelenség, az irodalomban már leírták a CYN degradációját cianobakteriális pigmentek jelenlétében.⁹⁴ A sziklevelek vizsgálatához a fény hiánvában való nevelés nem kedvez, mert mint azt korábban a tanszék munkatársai kimutatták, a mikrocisztin-LR és a cilindrospermopszin esetén sötétben a csíranövények sziklevele nem változik szignifikánsan a cianotoxinok hatására. Fény hiányában a kontrollnövény sziklevelei is csak alig növekednek, méretük átlagosan 6,5 x 3,2 mm volt. A cianotoxinnal kezelt mustárnövények átlagos nedvestömegét tartalmazza az 61. ábra.



61. ábra A mustárnövények nedvestömegének változása az alkalmazott cianobakteriális nyerskivonat függvényében

A nedvestömegeknél hasonló tendenciát tapasztaltunk, mint a hosszadatoknál. A nedvestömeg adatok alapján az 50 %-os növekedésgátlást előidéző koncentráció (IC₅₀) sötétben a 2, 3 és 4 napos növényeknél rendre 1600, 1600 és 3000 μ g/ml körüli érték. Felvetődik, hogy a mustár csíranövények képesek lebontani a növényi növekedés inhibítor vegyületet vagy a szóban forgó komponens stabilitása változhat.

Összeségében elmondható, hogy a nyerskivonat egyaránt gátolta a mustárnövény gyökerének és hypokotyljának növekedését. A gátlás mértéke időben csökkenő tendenciát mutat, az IC_{50} érték 800 és 1600 µg/ml közé esett. A toxicitás mértéke a hosszadatokban jobban megnyilvánul mint a tömegadatokban. A három vizsgált időpont közül a három napos adatok a leginformatívabbak, így célszerűnek látszik a tiszta toxinos kezelés hatását az ültetéstől számított harmadik napon vizsgálni. A nyerskivonattal történt kezelések

bebizonyították, hogy a 2 napos növények még túl kicsik a toxinhatás vizsgálatához, míg a 4 napos növények esetén többször is tapasztaltuk, hogy a kontrollt és kis koncentrációjú toxint tartalmazó mikrotiter lemezen a növény teljesen "megeszi az agart".

4.14. A tisztított cilindrospermopsziciklinnel kezelt mustárnövények növekedése

A tisztított CYC-cel végzett kísérleteket 3 napos növényeken végeztük. A **62. ábrán** tüntettem fel a 3 napos növények adatait (hypokotyl- és gyökérhossz, valamint nedvestömeg).



62. ábra A tisztított cilindrospermopsziciklinnel kezelt mustárnövények képei és adatai

Hasonlóan a nyers kivonatnál tapasztaltakhoz, a mikrocisztinnel ellentétben itt sem tapasztaltunk az alacsonyabb koncentrációk esetén növekedésserkentést. A *C. raciborkii* (BGSD 266) cianobaktériumból izolált toxikus anyagcseretermék (nyerskivonat) erőteljesen gátolja a gyökérzet kialakulását és fejlődését. Számos kutató a mikrocisztinhez hasonló hatású proteinfoszfatáz-gátló toxinok, növények gyökerére kifejtett hatását vizsgálta és a gyökérrendszer, illetve a gyökér és gyökérszőr kialakulásának gátlását tapasztalta.¹²⁵ Azonban a mikrocisztin-LR esetén csak az oldalgyökerek számának csökkenését figyelték meg munkatársaink.¹²⁵ Az előzetes vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy a hossznövekedés mellett az oldalgyökerek képződését is gátolja az általunk izolált cianotoxin (ezen adatokat a dolgozatban nem mutatjuk be). Az oldalgyökerek száma számos környezeti tényező függvénye lehet, ilyen például a tápközeg agartartalma és a nevelőedény alakja, ezért valamennyi növekedési kísérletet hasonló kiképzésű edényben, és hasonló szilárdságú (1%-os) agaron végeztük. A külső morfológiai változások alapján az általunk újonnan izolált cianotoxin (CYC) hatását összehasonlítva a már ismert és tanulmányozott mikrocisztin-LR és

cilindrospermopszin hatásával a következők mondhatók el: a mikrocisztinnel kezelt növények nem csak méretükben kisebbek mint a kontrollnövények, hanem külső morfológiájukban is eltéréseket mutatnak; nekrotikus foltok jelennek meg a szikleveleken és a gyökérnyakon.¹²⁵ A cilindrospermopszinnal kezelt növényeknél ezzel szemben csak a növekedés erőteljes gátlása érvényesül. Hasonló, csak a növekedésre kifejtett hatás figyelhető meg az általunk izolált cianotoxin esetén is. Így elmondható, hogy a tisztított cianobakteriális anyagcseretermék hatásmechanizmusa eltér a mikrocisztinétől, mivel nem idézi elő a fentebb említett morfológiai változásokat. A cilindrospermopszinnal való összehasonlításhoz azonban további vizsgálatok szükségesek. Mind a hosszadatok csökkenése, mind a nedvestömeg adatok izolált változása alátámasztja az növényi növekedésgátló anyagcseretermék mustárcsíranövényre gyakorolt toxikus hatását. A hosszadatok alapján az 50 %-os növekedésgátlás hypokotyl és a gyökér esetén is 400-600 µg/ml, míg a nedvestömeg esetén 600 µg/ml koncentrációértéknek adódott.

Összegezve elmondható, hogy az általunk cilindrospermopsziciklin IC₅₀ értéke 600 μg/ml, amely egy közepesen erős cianotoxin IC₅₀ értékének felel meg. Hatását tekintve a C. raciborskii (BGSD-266) szervezetből izolált CYC eltér a mikrocisztin hatásától, mivel nem tapasztaltunk az alacsonyabb koncentrációknál növekedésserkentést, illetve magasabb koncentrációknál nekrotikus folt megjelenését. A legnagyobb alkalmazott cianotoxin koncentrációk esetén is elkezdődik a mustárnövény fejlődése, nagyon kevés csíranövény magbazárt állapotban. Nagy cianotoxinkoncentrációknál а maradt gyökérnyak megvastagodása figyelhető meg a cilindrospermopszinhoz hasonlóan. A C. raciborskii cianobaktériumból izolált úi cianotoxin hatásmechanizmusának részletesebb tanulmányozására és megértésére növényi anyagcserét érintő vizsgálatok szükségesek. A cianotoxin növényi szövetekre gyakorolt hatásának vizsgálata nem tárgya a dolgozatnak, bár mind a nyerskivonattal, mind a tiszta CYC-cel kezelt növények esetén is készültek szövettani metszetek (ezen adatokat a dolgozatban nem mutatjuk be).

4.15. A fehérjemintázat változása a C. raciborskiival kezelt növényekben

Irodalmi adatok alapján a csíranövények fejlődéséhez 3-4 napig elegendőek a sziklevélben raktározott fehérjék, szénhidrátok és lipidek. A csíranövények fejlődése során élénk anyagcsere figyelhető meg, *de novo* szintetizált fehérjék és enzimek működése jellemző.

A cianotoxin kezelés hatására tapasztalt növekedésgátlás, stresszfolyamatokat feltételez, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk izolált toxikus anyagcseretermékkel történő kezelés a mustárnövényekben indukálja-e a fehérjék szintjének változását, illetve miként hat a konstitutív fehérjék mennyiségére. Kísérleteink során vizsgáltuk a tisztított cianotoxinnal (CYC) történő kezelés koncentrációfüggését.

A cianobakteriális nyers kivonat és a CYC hatására bekövetkező változások alapján a kimutatott fehérjék a következő osztályokba sorolhatók:

- 1. Azon fehérjék csoportja, melyek mind a kontroll, mind a toxinkezelt mintában közel azonos mennyiségben jelennek meg (az ábrákon fekete színnel jelölve);
- Azon fehérjék, melyek mennyisége a toxinkezelés hatására növekedett (az ábrákon zöld színnel jelölve);
- Azon fehérjék, melyek mennyisége a toxinkezelés hatására csökkent (az ábrákon piros színnel jelölve);
- 4. Az újonnan megjelenő fehérjék csoportja (az ábrákon kék színnel jelölve).

A **63. ábrán** láthatók a cianobakteriális nyers extraktummal kezelt 2, 3, és 4 napos mustárnövények kivonatának fehérjemintázat adatai. A fehérje gélre a kontroll, a 200 μ g/ml, 800 μ g/ml és a 1600 μ g/ml cianobakteriális nyers kivonattal kezelt mustárnövények kivonatait vittük fel. A táblázatban az "1", "2", "3" és "4" számok a fentebb említett négy fehérjecsoportot jelentik.



63. ábra A nyers cianobakteriális kivonat hatása a mustárnövény fehérjeháztartására

A gélek kiértékelése táblázatos formában történt. A táblázat első sora az egyes fehérjék molekulatömegét tartalmazza, az azt követő sorokban az adott molekulatömegnek megfelelő sáv és a sávra jellemző, fentebb említett sorszám található.

A mustárnövény fehérjemintázatának változásait a tisztított CYC esetében is megvizsgáltuk. A kapott eredményeket a **64. ábra** tartalmazza. A táblázatban az "1", "2", "3" és "4" számok a fentebb említett négy fehérjecsoportot jelentik.



64. ábra A tiszta cianotoxin hatása a mustárnövény fehérjeháztartására

Összefoglalva elmondható, miszerint a tisztított cilindrospermopsziciklin hatására a kontrollhoz képest négy újonnan megjelenő, 19,0, 19,6, 20,1 és 21,7 kDa molekulatömegű fehérjét találtunk, melyek közül a két első a nyers kivonatos kezelés hatásra is megjelenik (az ábrán kék színnel jelölt adatok). Számos fehérje sávjának az intenzitása növekedett a toxinkezelés hatására (az ábrán zöld színnel jelölt adatok). Azokban az esetekben ahol a táblázatban két érték is szerepel, a fehérjesávok intenzitása növekedni, majd egy maximális érték után csökkeni kezdett (az ábrán rózsaszín színnel jelölt adatok).

4.16. Enzimvizsgálatok a *C. raciborskii* nyers kivonatával és a szervezetből izolált cilindrospermopsziciklinnel kezelt mustárnövényekkel

4.16.1. A proteázok gélelektroforézise

Az előkísérleteket nyers cianobaktérium kivonattal kezelt 3 napos, etiolált mustárnövényekkel folytattuk. Tapasztalataink alapján 10 µg fehérjetartalomra volt szükség a megfelelő proteázaktivitás kimutatására. A nyerskivonatos minták futtatásánál több inkubálási

időt is kipróbáltunk (4, 8 és 20 óra). Ezt úgy valósítottuk meg, hogy a kipróbálni kívánt inkubálási idő függvényében a mintákat két sorozatban vittük fel a gélre. Ezután a mintákat megfuttatva és a sorozatokat megjelölve a géleket az "Anyagok és módszerek" részben leírt mosási protokollnak vetettük alá. Az inkubálást két különböző pH-értéken a teljes géllel kezdtük, majd az előre meghatározott idő elteltével egy sorozatnyi mintát levágtunk a gélről és Comassie Brilliant Blue R-250 festékkel megfestettük.



65. ábra A proteázenzimek aktivitásának változása

A gélek inkubálására a két pH-érték közül (5,0 és 8,0) a pH=5,0 volt a legalkalmasabb. Az inkubálási idő változása nem befolyásolja az izoenzimek megjelenését, így a 8 órás inkubálás megfelelőnek bizonyult. Mint az adatokból is látható, a proteázaktivitás csökkenése figyelhető meg a koncentráció növekedésével, ez a hatás a tiszta cianotoxinos kezelés esetén markánsabb (**65. ábra**). Mivel a vizsgálatok tájékozódó jellegűek, a cisztein-proteázok további karakterizálásától eltekintettünk.

4.16.2. Az izolált cilindrospermopsziciklin hatása a mustárnövény-nukleázok aktivitására

Az általunk izolált toxikus anyagcseretermék (CYC) gátolja a mustárnövény fejlődését, valamint új fehérjék megjelenését okozza, ezt a mustár fehérjék gélelektroforézises vizsgálatai bizonyították. Az előbbiek alapján felmerül a kérdés, hogy a stresszfolyamatokra jellemző enzimváltozások közül a növényi hidrolitikus enzimek egy jellegzetes csoportjának, az egyszálú DNS-eket specifikusan bontó enzimcsoport aktivitásnövekedése megfigyelhető-e? A géleket a megfelelő mosási eljárás után (amivel az SDS-t eltávolítjuk a rendszerből és renaturáljuk a fehérjéket) a géleket pufferben inkubálva, majd etídium-bromiddal megfestve az aktív helyeken sötét foltok jelennek meg (negatív festés). Ez jelzi azokat a fehérjéket, melyek az egyszálú DNS-t szubsztrátként tudják hasznosítani. Mivel az általunk izolált és vizsgált toxikus metabolittal még nem folytattunk kísérleteket, ezért szükségesnek tartottuk a nyers kivonattal történő előkísérleteket. Az előkísérletek célja a megfelelő inkubációs pH-érték megválasztása volt. A megfelelő inkubációs pH kiválasztásakor a 3 napos kontrollnövények kivonatát együtt futattuk meg egy 50 %-osan és egy 90 %-osan gátolt nyers kivonattal kezelt növény kivonatával. Az 5-től 10-ig terjedő pH-tartományt tanulmányozva azt találtuk, hogy az M-Hamvas által javasolt¹²⁵ pH=6,8 és 8,5 értékek a legalkalmasabbak a mustár ssDN-áz izoenzimek vizsgálatára. Új izoenzim megjelenését a kezelés hatására nem tapasztaltunk. A növekvő koncentrációval az izoenzimek aktivitása csökkent. A nukleáz-gélek inkubálása 6,8-as és 8,5-as pH-n történt. 6,8-as pH-n megjelenik a 90 kDa-os, a 80 kDa-os a 40 kDa-os, a 33kDa-os valamint halványan a 25 kDa-os izoenzim. A 8,5-ös pH-n történő inkubálásra hatására az 90 kDa-os valamint halványan a 60 kDa-os izoenzim jelenik meg. A cianobakteriális nyerskivonattal történő kezelés hatására az izonzimek aktivitása csökken. A tiszta toxinnal végzett kísérletekhez is 3 napos mustárnövényeket használtunk. Ugyanazt a tendenciát tapasztaltuk, mint a nyers kivonat esetén, azaz az enzimaktivitás csökken a koncentráció növekedtével (66. ábra).



4.17. A tápeleméheztetés hatása a *C. raciborskii* cianobaktérium növekedésére és toxintermelésére

A kutatócsoportunk már vizsgálta az *Aphanizomenon ovalisporum* cianobaktérium esetén az obligált fotoautotrof élőlények szempontjából létfontosságú foszfor és kén hatását a cilindrospermopszin termelésre.¹¹³ A *C. raciborskii* sejtek cianotoxintartalmának vizsgálatát vékonyrétegkromatográfiával követtük nyomon a kontroll és az éheztetett tenyészetekben. A nem éheztetett tenyészetek esetén a toxintartalom a sejtek növekedésével együtt növekedett, majd a stacioner fázisban a sejtek növekedésével párhuzamosan leállt. A tápelemhiány vizsgálatára az Allen tápoldatban a foszfát-, illetve szulfátkomponenseket ugyanolyan kationú nitrát-, illetve kloridtartalmú komponensekre cseréltük. Az előzetes tapasztalatok alapján a tápelem hiányos, illetve teljes médiumokban az $A_{800}=0,2$ -es optikai denzitás felé oltottuk a tenyészeteket, és minden kísérletből két párhuzamos mérést végeztünk. Ezen mérések adatait

tartalmazzák a **67.**, **68.** és **69. ábrák**, melyek jól mutatják, hogy mind a kén-, mind a foszformegvonás növekedésgátló hatással volt a tenyészetekre. A kontroll tenyészetekben a sejtek növekedése 3 napig tartó lag fázis után megindult és a 12 napra elérték a kezdeti érték hatszorosát (**67. ábra**).



67. ábra A kén-, illetve a foszforéhezetett *C. raciborskii* tenyészetek optikai denzitásának változása az idő függvényében



68. ábra A kén-, illetve foszforéhezetett *C. raciborskii* tenyészetek klorofill-a tartalmának változása az idő függvényében

Az éheztetett tenyészetek sejttartalma a lag fázis után minimálisan emelkedik, de így sem éri el a kiindulási érték kétszeresét. Hasonló tendenciát találunk a klorofill-a tartalom esetén is, az éheztetett tenyészetek alig érik el a kiindulási érték kétszeresét (**68. ábra**).



69. ábra A kén-, illetve foszforéhezetett *C. raciborskii* tenyészetek fehérjetartalmának változása az idő függvényében

A fehérjetartalomról is ugyanez mondható el (**69. ábra**). Az egyedüli növekvő tendenciát mutató adatsor a szárazanyagtartalomnál található, de itt sem éri el a nem éheztetett tenyészetek értékét (**70. ábra**).



70. ábra A kén-, illetve a foszforéhezetett *C. raciborskii* tenyészetek szárazanyagtartalmának változása az idő függvényében

A mért növekedési görbéken kívül vizuálisan is figyeltük a tenyészeteket és azt tapasztaltuk, hogy az éhezetett tenyészetek elkezdenek sárgulni, majd a kísérlet végére teljesen elveszítik zöld színüket. Felvetődött a kérdés, hogyan változik a toxikus anyagcseretermék koncentrációja az éheztetett tenyészetben. Ennek vizsgálatára az általunk kidolgozott vékonyrétegkromatográfiás eljárás megfelelőnek bizonyult. Pontos toxinkoncentrációt ugyan nem szolgáltatott, de a minták párhuzamos futtatásával lehetőség nyílt a foltok intenzitásának összehasonlítására. Ebben az esetben nem szükséges a mintaelőkészítés, mivel kidolgoztunk egy olyan előfuttató rendszert, amelyben a vizsgálni kívánt komponens a startponton marad, míg a színanyagok túlfutnak a 0,5-ös R_f –értéken (**71. ábra**).



71. ábra A tápeleméheztetett cianobakteriális nyerskivonatok szilikagéles futtatása kis polaritású oldószerelegyben (a cianotoxin a startponton marad)

Ezek után egy polárisabb oldószerelegyben a réteghossz feléig futtatva a réteget, a toxikus anyagok is elmozdulnak a startpontról. A foltintenzitásokból jól látható, hogy lényegesen kevesebb toxin található az éheztetett tenyészetekben mint a teljes médiumban neveltekben.



72. ábra A tápeleméheztetett cianobakteriális nyerskivonatok szilikagéles futtatása nagy polaritású oldószerelegyben (a cianotoxin elmozdul a startpontról)

Ezen megfigyelések után felmerül a kérdés, hogy a kén-, illetve foszforlimitáció, mint stressztényező okoz-e – és ha igen milyen – változást a fehérjeháztartásban. Ennek a kérdésnek a megválaszolására a tenyészetből vett mintákat SDS-poliakrilamid gélen futattuk. A tapasztalt változásokat a **73.** és **74. ábrán** tüntettük fel. A minták könnyebb összehasonlítása céljából az éheztettet és nem éheztetett mintákat egymással párhuzamosan futtattuk meg, így a bekövetkező változások jobban nyomonkövethetőek voltak. A tapasztalatok alapján elmondható, hogy ezek a változások a kén-, illetve foszformegvonás hatására következtek be, mivel a tenyészeteket ugyanabból az inokulumból oltottuk, illetve

ugyanolyan körülmények között neveltük egymás mellett. A foszfor-, illetve kénlimitáció hatására a tenyészetek növekedése leáll, a tapasztalt minimális növekedés a raktározott tápanyagoknak köszönhető. A vékonyrétegkromatográfiás képekből, illetve a mért toxicitási adatokból kiderül, hogy jelentősen csökken a termelt CYC mennyisége is. A **73.** és **74. ábrán** a kén- és foszforéheztetett tenyészetek fehérjemintázata látható, a géleken a éheztett tenyészetekkel párhuzamosan a kontroll tenyészetek mintáit is megfuttattuk.

	— 118,4 kDa — 111,5 kDa	Újonnan megjelenő fehérjék	Csökkenő intenzitású fehérjék
— — 94 kDa	— 84,8 kDa	118,4 kDa	111,5 kDa
— 67 kDa	42.8.60	84,8 kDa	42,8 kDa
- 43 kDa	42,0 ADA 41,9 kDa 	66,5 kDa	41,9 kDa
	36,1 kDa — 26,9 kDa	38,6 kDa	36,1 kDa
30 kDa			26,9 kDa
- 20,1 kDa	ananan P		24,1 kDa
			22,1 kDa

kontroll tenyészet kénéheztetett tenyészet73. ábra A normál és a kénéheztetett tenyészet fehérjemintázata

Mint látható, kénéheztetés hatására négy új fehérje sávja jelenik meg és számos sáv intenzitása csökken.



74. ábra A normál és a foszforéheztetett tenyészet fehérjemintázata

Mint látható, négy újonnan megjelenő fehérjét, két növekvő intenzitású és két csökkenő intenzitású fehérjét tudtunk detektálni.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy a kén-, illetve foszforéheztetett tenyésztek növekedése csökken, majd leáll, hasonlóan a már vizsgált *A. ovalisporumhoz*.

4.18. A Kis-Balatonból izolált cianobakériumok mikrocisztintartalmának meghatározása

A 2001-es évben a Kis-Balatonban vízvirágzás volt megfigyelhető, amelyből származó plankton mintát szűréssel és/vagy centrifugálással koncentráltuk. Az így nyert üledékből számos mikrocisztin típusú vegyületet izoláltunk. Az izolálás három lépésből állt, az első lépés a DEAE cellulóz oszlopon való elúció volt. Az elválasztás során kapott kromatográfiás frakciók 240 nm-en való fényelnyelését a frakciószám függvényében ábrázoltuk (**75. ábra**).



75. ábra A M. aeruginosa nyerskivonatának DEAE cellulózos tisztítása

A toxikusnak azok a frakciók mutatkoztak, ahol a legnagyobb volt 240 nm-n a fényelnyelés. A mikrocisztin tartalmú frakciók elkülönítését az is segítette, hogy a vizsgált koncentrációk esetén is megjelentek a növényeken a mikocisztinek hatására jellemző nekrotikus foltok. Az izoláció második lépése a C-18 Sep-Pack Plus tölteteken történő tisztítás volt, amelyet amennyiben szükséges volt egy további Toyopearl tisztítást követett.

A tisztítás utolsó lépésében DAD-HPLC-t alkalmaztunk, amely segítségével könnyen felismerhetőek voltak a mikrocisztint tartalmazó frakciók jellegzetes spektrumuk alapján, A vegyületek azonosítása tömegspektrumuk alapján történt. Az izolátumban alapvetően négy mikrocisztint tudtunk kimutatni, ezek a MCYST-LY, [D-Ser⁷]MCYST-EE(OMe), MCYST-HilR, [Dha⁷] MCYST-FR voltak. A vegyületek szerkezete a következő (**76. ábra**):



76. ábra A M. aeruginosa 3T izolátumból kimutatott mikrocisztinek szerkezeti képlete

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a kis-balatoni planktonmintából négy, már ismert mikrocisztint tudtunk izolálni és azonosítani.

4.19. A pterokarpán váz jellegzetes fragmentációs útvonalai

Az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon előálított pterokarpánszármazékok jellegzetes fragmentációs útvonalait, bomlási szabályszerűségekeit a deutériumot nem tartalmazó pterokarpán esetében mutatom be, táblázatban mellékelem az egyes deuterált származékoknak megfelelő m/z és intenzitás értékeit. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a vizsgált pterokarpánokat ismételten feltüntettem, a **77. ábrán**.



77. ábra A tömegspektrometriával vizsgált pterokarpánok

A jellegzetes fragmensionokat, valamint az egyes ionokra kapott nagyfelbontású eredményeket a pterokarpán példáján szemléltetve a **78. ábra** mutatja.



78. ábra A pterokarpán jellegzetes fragmensei (m/z: számolt; *m/z: mért)

A jellegzetes fragmens ionok tömegét és a csúcsok intenzitását a pterokarpánra és az egyes deuterált származékokra vonatkozóan a **11.** táblázat tartalmazza.

Vegyület		1	2	3	4	5	6	7	8
M+•		224 (100)	225 (100)	225 (100)	225 (100)	226 (100)	226 (100)	226 (100)	227 (100)
$[M-X]^+$	<u>1</u>	223 (75)	224 (75) 223 (12)	224 (80)	224 (50) 223 (12)	225 (75) 224 (30)	225 (43) 224 (25)	225 (65) 224 (25)	226 (83) 225 (53)
[M-OX [•]] ⁺	<u>2</u>	207 (12)	208 (11)	207(7)	208 (8)	208 (11)	209 (9)	208 (8)	209 (12)
	<u>3</u>	205 (9)	206 (7) 205 (4)	205 (6)	206 (7) 205 (4)	206 (7) 205 (4)	207 (5) 206 (5) 205 (4)	206 (8) 205 (3)	207 (8) 206 (6) 205 (-)
	<u>4</u>	195 (5)	195 (2)	196 (4)	196 (4)	196 (3)	196 (2)	197 (8)	197 (3)
*OH	<u>5</u>	181 (7)	182 (3) 181 (2)	181 (5)	182 (3) 181 (4)	182 (3) 181 (3)	182 (4) 181 (3)	182 (4) 181 (4)	182 (8) 181 (2)
$\bigcirc \bigcirc \bigcirc \bigcirc \bigcirc$	<u>6</u>	165 (15)	166 (12) 165 (5)	165 (7)	166 (12) 165 (10)	166 (12) 165 (10)	166 (7) 165 (4)	166 (12) 165 (5)	166 (10) 165 (5)
	<u></u>	152 (9)	152 (6)	152 (4)	152 (2)	152 (3)	152 (3)	152 (2)	152 (4)
	<u>8</u>	131 (42)	132 (35)	132 (28) 131 (30)	132 (32) 131 (7)	133 (18) 132 (38)	133 (34) 132 (16)	133 (22) 132 (31)	134 (15) 133 (52)
OH+	<u>9</u>	121 (2)	121 (2)	122 (1)	121 (1)	122 (2)	121(3)	122 (2)	122 (2)
	<u>10</u>	118 (45)	119 (20) 118 (25)	119 (29) 118 (32)	119 (10) 118 (8)	120 (14) 119 (33)	119 (42) 118 (8)	120 (12) 119 (35)	120 (31) 119 (45)

11. táblázat A pterokarpán és a deuterált származékok fragmenseinek tömegei és intenzitásai

A feltüntetett vegyületek valamennyi esetben nagy stabilitású molekulaiont adnak. Mint a táblázatból látható, ezek adják a spektrumok báziscsúcsát. A nagy intenzitású molekulaioncsúcs alkalmasnak bizonyult nagyfelbontású (R=15000), pontos tömegmérésre. A deuterált vegyületek molekulaionjainak számított és mért pontos relatív tömegértékeit a **12.** táblázat tartalmazza. Mint látható, az elméleti és a kísérleti adatok kitűnő egyezést mutatnak, ami igazolta a vegyületek szerkezetét.

Az M ^{+•} ion nagyfelbontású MS adatai (m/z)					
Vegyület	Összegképlet	Számított érték	Mért érték		
1	$C_{15}H_{12}O_2$	224,0797	224,0802		
2	$C_{15}H_{11}DO_2$	225,0900	225,0905		
3	C ₁₅ H ₁₁ DO ₂	225,0900	225,0908		
4	$C_{15}H_{11}DO_2$	225,0900	225,0904		
5	$C_{15}H_{10}D_2O_2$	226,0963	226,0967		
6	$C_{15}H_{10}D_2O_2$	226,0963	226,0970		
7	$C_{15}H_{10}D_2O_2$	226,0963	226,0966		
8	$C_{15}H_9D_3O_2$	227,1026	227,1035		

12. táblázat A deuterált pterokarpánok molekulaionjainak pontos tömegei

A második legnagyobb intenzitású fragmens a $[M-H^+]$ ion, ami többféleképpen is keletkezhet. Egyrészt létrejöhet a 6-os hidrogén (illetve deutérium) vesztésével a pterokarpán molekulaionból, illetve az ebből átrendeződéssel képződött izoflavanonból, vagy (a hidrogénvándorlással létrejött) enolformából. További érdekesség még, hogy 11a és a 6a szénatom közötti kötés-alfa hasadásával egy olyan molekulaion jön létre, ami szintén képes hidrogént veszíteni. Ennek a formának a fontosságára később majd külön kitérek. Lehetséges még a 11a helyzetű hidrogén vesztése ami az alapvázból, vagy az enolformából valósulhat meg (**79. ábra**). Ha összehasonlítjuk a **11. táblázat** 1. és 2., valamint 3. és 5. oszlopát, az intenzitásértékekből kitűnik, hogy a 6-os helyzetű hidrogén vesztése a kedvezményezett. Amennyiben deutérium van a hidrogén mellett (6-os szénatom), akkor inkább a hidrogén távozik, ami világosan következik a táblázat 4., 6., 7., és 8. sorainak adataiból.



79. ábra Az $[M-H^+]$ (*<u>1</u>) fragmens képződése*

Azz $[M-OX^{\bullet}]^{+}$ fragmens (<u>2</u>) az izoflavanon molekulaion enolformájából ($M^{+\bullet}(b)$) jön létre hidroxilgyök vesztéssel (**80. ábra**). Az intenzitás adatok alapján elmondható, hogy a deutériummal jelzett származékok intenzitásai nagyobbak.



80. ábra Az $[M-OX^{\bullet}]^{+}$ (2) fragmens képződése

A táblázatban szereplő <u>3.</u> sorszámú fragmens az enolformából származtatható víz és az azt követő hidrogéngyök vesztésével (**81. ábra**). Az intenzitásadatokból itt is látszik, hogy a hidrogén-, és nem a deutériumvesztés a kedvezményezett abban az esetben, ha mind a kettő megtörténhet.



81. ábra Az enolformából történő vízkilépés és hidrogéngyök-vesztés

A fentebb említett az α -kötés hasadási mechanizmus során jön létre a **M**⁺(**d**) molekulaion. Ennek a molekulaionnak a további fragmentációját láthatjuk a **82. ábrán**.



82. ábra Az α-kötés-hasadással létrejött molekulaion további fragmentációja

Ebből a molekulaionból további töltésátrendeződés ($M^{+*}(e)$), majd formaldehid gyök (COH^{*}) vesztés után jön létre az m/z 195-ös ion (<u>4</u>). Ez megvalósulhat úgy is, hogy először egy hidrogéngyök-vesztés, majd szén-monoxid vesztés történik. A kapott kation jelének intenzitása valamennyi, különböző helyen és mértékben deuterált molekula esetén kicsi.

Az $\mathbf{M}^{+\bullet}(\mathbf{d})$ molekulaionból kiindulva a hidrogén-vándorlás történhet úgy is, hogy nem nyílik fel a gyűrű, hanem az eredetileg *11-es* oxigénen lévő pozitív töltés áttevődik a másik *5-ös* oxigénre, miközben az egyik *6-os* helyzetű hidrogén a *11a* szénatomra vándorol $\mathbf{M}^{+\bullet}(\mathbf{f})$, majd a kettős kötés a *6-6a* szénatomok közé rendeződik át $\mathbf{M}^{+\bullet}(\mathbf{g})$. A kis stabilitású m/z 182 ion egy etilénoxid vesztése után jön létre. Ez a fragmens hidrogéngyököt veszít, majd átrendeződik, így adja az m/z 181-as iont (<u>5</u>). (**83. ábra**)



83. ábra Különböző szerkezetű m/z 181 ionok megjelenése

Valamennyi vizsgált vegyület esetén elmondható, hogy a deutériumot tartalmazó forma a kedvezményezett. A kis intenzitású m/z 182 ion formaldehidvesztéssel adja az m/z 152 fragmenst ($\underline{7}$), ami kettéhasad és egy változó intenzitású csúcsot adó benzingyök-kationt (m/z 72) eredményez. A már említett m/z 181 fragmens közvetlenül a molekulaionból **M**^{+•}(**d**) is létrejöhet átrendeződés után, acetaldehid-gyök vesztéssel. Az m/z 181-es ion formaldehidgyök vesztéssel eredményezi az m/z 152-es iont (**84. ábra**):



84. ábra Az m/z 152-es fragmens keletkezése

Az átrendeződött molekulaionból aldehidgyök vesztést (m/z 195) követő átrendeződés után, ismételt aldehidmolekula vesztéssel jön létre az m/z 165-ös ion (*6a,6b*), mely nagy intenzitású (**85. ábra**).



85. ábra Az α-kötéshasadás után átrendeződött molekulaion további fragmentációja

Itt is megmutatkozik az a tendencia, hogy a deutériumot tartalmazó szerkezeti részek intenzitása nagyobb, mint a hidrogént tartalmazóké.

Ha a molekulaion átrendeződése során a *11a* szénatom és a benzolgyűrű megfelelő szénatomja közötti kötés homolitikusan hasad, akkor a molekulaion $M^{+}(i)$ további hidrogén vándorlás során eredményezi az $M^{+}(j)$ szerkezeteket. A $M^{+}(k)$ -ből az 5-ös számú oxigén és a 6-os szénatom homolitikus hasadása során létrejövő m/z 131 ion ciklizálódik, így egy stabil pirillium (<u>8a</u>) szerkezet alakul ki (**86. ábra**) amelynek nagy stabilitását a csúcsintenzitások jól tükrözik.



86. ábra A 10a pirilliumszerkezet kialakulása

Az M⁺(j) molekulaionból képződhet benzofurán-gyökkation (<u>10a, 10b</u>) is (87. ábra):



87. ábra A <u>10a</u> és <u>10b</u> benzofurán-gyökkationok

A benzofurán-gyökkationok (*10a,10b*) esetén érdemes megnézni a **11.** táblázat adatait, ugyanis a 2. és az 5. vegyület értékeit összehasonlítva látható, hogy a *10b* forma fordul elő

nagyobb gyakorisággal. Ezenkívül a 3. és a 7. vegyületre vonatkozó adatokból megállapítható az is, hogy a deutériumot tartalmazó vegyület az, ami nagyobb intenzitású (kék színnel jelölt atom, mely ezekben az esetekben lehet hidrogén, illetve deutérium).

Végül, de nem utolsó sorban meg kell említeni azt a molekulaion szerkezetet ($M^{+*}(I)$), amely a *6a* szénatom és a benzolgyűrű megfelelő szénatomja közötti kötés homolitikus hasadását ($M^{+*}(m)$) követő hidrogénvándorlás során jön létre. Az így keletkezett forma ($M^{+*}(n)$) benzolgyökvesztés után adja a m/z 147 kroménszármazékot. A hidrogének elhelyezkedése alapján itt is két szerkezet írható fel. Ezen fragmensek intenzitásai kicsik, az intenzitások közötti különbség az egyes származékok esetében nem túl nagymértékű. Az említett m/z 147 ion acetilénvesztéssel adja az m/z 121 kationt (<u>9</u>), amelyből egy szén-monoxid vesztés történik (m/z 93) (**88. ábra**).



88. ábra A 6a szénatom és a benzolgyűrű szénatomja közötti kötés homolitikus hasadásával létrejött M⁺ fragmentációja

A pterokarpán molekulaionból hidrogénvándorlás során létrejövő izoflavanon molekulaion fragmentációját láthatjuk a **89. ábrán**. A hidrogénvándorlást követő gyűrűhasadással létrejött forma kettéhasad az m/z 121 kationra (*9*) és egy sztirilgyökre.



89. ábra Az izoflavanon molekulaion fragmentációja

A ketoformából történő aldehidvesztés során jön létre az m/z 194 gyökkation, mely hidrogénvesztést követő gyűrűzáródás után egy stabilabb szerkezetre tesz szert (m/z 193). Ebből egy szén-monoxid vesztéssel kapjuk az m/z 165 fragmensiont (6b). Ebben az esetben csak egyféle hidrogénelrendeződés valósulhat meg (6b). Ha az izoflavanon forma szénmonoxidot veszít (m/z 196), akkor további kötéshasadást követő benzolvesztéssel kaphatjuk meg a pterokarpánok egyik jellegzetes fragmensét, a benzofurán-gyökkationt (10b), azonban ennek а hidrogénelrendeződése nem azonos annak а benzofuránnak а hidrogénelrendeződésével, amelyet a gyűrű hasadásával kapunk.

Az keto-formából képződhet még gyűrűhasadással az m/z 120 (RDA ion), illetve az m/z 104 fragmens (**90. ábra**).



90. ábra A ketoforma gyűrűhasadása

Végezetül nézzük meg, milyen lehetőség van a pterokarpán molekulaionból, annak kötéseinek szimultán hasadásával fragmensképződésre. Ha a benzofurán gyűrű kötései hasadnak, akkor egy benzoxiránt és egy m/z 132 (3,4-benzokromén) fragmenst kapunk. Ez utóbbi hidrogénvándorlással tovább alakulhat fahéjaldehiddé, illetve hidrogéngyökvesztéssel aromatizálódhat benzopirillium ionná (*8b*). Az így létrejövő szerkezet (*8b*) hidrogénelrendeződése eltér a *8a* pirillium kationétól. Ha az m/z 162-es fragmens formaldehidet veszít, az m/z 102 szerkezet jön létre (**91. ábra**).



91. ábra Szimultán kötéshasadással létrejött fragmensek

Visszatérve a pirilliumszerkezetre, az 1-es, 2-es, 4-es és 6-os számmal jelzett pterokarpánok esetén nincs m/z érték növekedés amiatt, hogy a zölddel jelzett atom hidrogén.

Ha azokat a vegyületeket nézzük meg, amelyekben a kék jelű atomok mindkét tagja hidrogén, látható, hogy nagyobb intenzitással fordul elő az a szerkezeti forma, amely az M^{+} (g) molekulaionból az oxigén és a *6-os* szén közötti kötés hasadásával keletkezik (<u>8a</u>). Ezt az is indokolja, hogy a fentebb említett molekula esetén csak egy kötés hasadásának kell megtörténnie, míg a másik esetben (<u>8b</u>) két kötés szimultán hasad, mely folyamat energetikailag kedvezőtlen. Különböző ionizációs energiát alkalmazva a gyűrűhasadás során keletkező <u>8b</u> pirilliumszerkezet jelének intenzitása az ionizációs energia csökkenésével rohamosan csökken.

A <u>8b</u> szerkezet úgy is kialakulhat, hogy a kation szimultán kötéshasadást szenved (92. ábra):



92. ábra <u>8b</u> kialakulása

A kromanongyűrű hasadásával benzofurán-gyökkation (*10a*) jön létre, illetve egy olyan szerkezeti forma, mely két gyökcentrumot tartalmaz, ezért azonnal ciklizálódik, majd ionizálódik (m/z 116), s észlelhető a spektrumban. A benzofurán-kationból szén-monoxid vesztéssel kapható az m/z 90 fragmens, amely hidrogénvesztés után kétféle szerkezettel írható fel (m/z 89) (**93. ábra**).



93. ábra A pterokarpán-váz szimultán kötéshasadása

Összegzésként elmondható, hogy a pterokarpán az EI tömegspektrumban nagy intenzitású molekulaiont ad, ami a spektrum báziscsúcsa. Ez a nagy intenzitású molekulaion lehetővé teszi a vegyület azonosítását összegképlete alapján, nagy tömegfelbontás mérést végezve. A molekulaion jellegzetes fragmensei a [M-H]⁺, a pirillium és a benzofurán gyökkation. A részleges deuterált származékok esetén megállapítottuk, hogy amennyiben lehetőség van rá akkor mindig a hidrogén és nem a deutérium távozik gyökként.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy sikerült megvalósítani a Balatonból származó *Cylindrospermopsis raciborskii* (BGSD 266) cianobaktérium nevelését laboratóriumi között, amely lehetővé tette tömegtenyészetek előállítását.

A tenyészetből kromatográfiás eljárásokkal sikerült egy új növényi inhibítort izolálni, az általunk bevezetett szilikagéles tisztítás és vékonyrétegkromatográfiás nyomonkövetés lényegesen megnövelte az izolálás hatásfokát.

Szerkezetvizsgálati módszerekkel (NMR- és IR-spektroszkópia, MS) sikerült javaslatot tenni az izolált növényi inhibítor szerkezetére, melynek kémiai neve: 4-amino-5,10-dihidroxi-9-(hidroximetil)-13-imino-11-metoxi-6-metil-5,6,7a,9,10,11,11a,13-

oktahidropirano [2,3-*j*]pirimido[4,5-*e*][1,9,3]dioxaazacikloundecin-2(3*H*)-on, a vegyületnek a *cilindrosper-mopsziciklin* (CYC) triviális nevet adtuk.

Mustárnövénnyel végzett kísérleteink rámutattak arra, hogy az izolált mustár növekedését, IC₅₀ 600 anyagcseretermék gátolja a értéke $\mu g/ml.$ А fehérjegélelektroforézissel végzett kísérleteink alapján elmondható, hogy a tisztított cianotoxin hatására új fehérjék jelennek meg. A cianotoxin hatására csökken a mustár ssDN-ázának és a savas proteázénak aktivitása.

A *Cylindrospermopsis raciborskii* törzs tápanyagéheztetése (foszfor-, illetve kénmegvonás) a tenyészet növekedésének csökkenését idézi elő. A tápanyagmegvonás hatására csökken az általunk izolált cianotoxin mennyisége, melyet vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel határoztunk meg.

A Kis-Balatonból 2001-ben izolált *Microcystis aeruginosa* szervezetből sikerült izolálni négy mikrocisztint, melyek szerkezetét tömegspektrometriás módszerrel határoztuk meg. Az izolált mikrocisztinek a követekzők voltak: [Dha⁷]MCYST-FR, MCYST-HilR, MCYST-LY és [D-Ser⁷]MCYST-EE(OMe).

Sikerült előállítani a pterokarpán váz hét különböző deuterált analógját, melyek az irodalomban eddig míg le nem írt vegyületek. A deuterált származékok tömegspektrometriai vizsgálatával a természetes anyag fragmentációs útvonalát sikerült feltérképezni, megállapítottuk hogy a molekula jellegzetes fragmensei a következők: molekulaion, $[M-H^+]$ ion, $[M-OH]^+$ ion, pirillium-kation és benzofurán-gyökkation.

106

6. SUMMARY

Summarizing our results we conclude that culturing of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (BGSD 266) isolated from Lake Balaton can be succesfully performed under laboratory circumstances.

From *C. raciborskii* we have isolated a new plant growth inhibitor, named to cylindrospermopsicyclin using chromatographic techniques. The purification method involves silica gel and the thin-layer chromatography introduced by us has significantly increased the efficiency of the isolation.

The chemical structure of cylindrospermopsicyclin has been identified using structure determination methods (NMR and IR spectroscopy and MS). The newly isolated molecule has molecular mass of 413 Da. The chemical name of cylindrospermopsicyclin is: 4-amino-5,10-dihydroxy-9-(hydroxymethyl)-13-imino-11-methoxy-6-methyl-5,6,7a,9,10,11,11a,13-octahydropyrano[2,3-*j*]pyrimido[4,5-*e*][1,9,3]dioxaazacyclo-undecin-2(3*H*)-one. For trivial name *cylindrospermopsicyclin* (CYC) was chosen.

Experiments showed that the isolated metabolite inhibits the growth of the mustard plant with the IC_{50} value of 600 µg/ml. By the protein gelelectrophoretic studies it can be concluded that the purified cyanotoxin induces new proteins. The cyanotoxin decreases the activity of the ssDNase and acidic protease of the mustard.

Nutrient starvation (deprivation of phosphorous or sulfur) of the strain *C. raciborskii* induces fall-off in the growth of the culture. The amount of cyanotoxin produced by the culture (determined by thin-layer chromatography) also decreased under nutrient starvation conditions.

In a seperate study we have isolated four microcystins ([Dha⁷]MCYST-FR, MCYST-HilR, MCYST-LY and [D-Ser⁷]MCYST-EE(OMe)) from the organism *Microcystis aeruginosa* isolated in 2001 from Kis-Balaton Reservoir. The structures of these microcystins have been identified by mass spectrometry.

We have succesfully synthesized seven deuterated analogues of pterocarpan. By mass spectrometric studies the fragmentation pathway of the natural compound has been mapped.
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Borbély Györgynek baráti jó tanácsaiért, szakmai iránymutatásaiért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Antus Sándor tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy hasznos gondolataival munkámat segítette, szintetikus munkámat irányította.

Köszönöm Dr. Dinya Zoltánnak szakmai irányítását, mellyel tömegspektrometriai méréseimet és az eredmények értékelését segítette.

Köszönöm a Növénytani Tanszék minden dolgozójának, hogy munkámat jó légkörben barátok között végezhettem. Külön köszönettel tartozom a cianobaktérium munkacsoport tagjainak: Dr. Surányi Gyulának, Dr. Mikóné Dr. Hamvas Mártának, Dr. Máthé Csabának, Bácsi Istvánnak, Tóth Szilviának, Havelant Katalinnak és Dr. Vasas Gábornak.

Dr. Batta Gyulának és Dr. Szilágyi Lászlónak az NMR mérésekért és a spektrumok kiértékelésében nyújtott segítségért tartozom köszönettel.

Köszönettel tartozom az izolált cianotoxin tömegspektrometriai méréseiért, és baráti segítségért Dr. Drahos Lászlónak.

Köszönöm Dr. Komáromi Istvánnak a molekulamodellezésben nyújtott segítségét.

Megköszönöm a Szerves Kémiai Tanszék munkatársainak preparatív munkámhoz nyújtott tanácsaikat és segítségüket.

Végül hálával tartozom családomnak türelmükért, megértésükért, a tőlük kapott szeretetért.

8. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

<u>Tóth E.</u>, Dinya Z., Antus S. Mass spectrometric sudies of the pterocarpan skeleton. *Rapid Communication is Mass Spectrometry* **2000**, 14, 2367-2370. Impakt faktor: 2,184.

<u>Tóth E.</u>, Dinya Z., Szilágyi L., Antus S. Synthesis of Deuterium Labelled Pterocarpans. *Heterocyclic Communication* 2001, 7, 257-262. Impakt faktor: 0,352.

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., <u>Tóth E.</u>, Grigorszky I.,
Gáspár A., Tóth Sz., Borbély Gy. Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or
phosphate-starved cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum. *FEMS Microbiol. Lett.*2006, 259, 303-310. Impakt faktor: 2.057.

<u>Tóth E.</u>, Vasas G., Surányi Gy., Dinya Z., M-Hamvas M., Máthé Cs., Bácsi I., Borbély Gy. Kis-Balatonból izolált cianobaktériumok mikrocisztin tartalmának meghatározása. *Hidrobiológiai közlöny* **2003**, 84, 166-167.

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., <u>Tóth E.</u>, Tóth Sz., Borbély Gy. Az Aphanizomenon ovalisporum cianobaktérium periplazmatikus alkalikus foszfatázának vizsgálata foszforéhezés körülményei között. *Hidrobiológiai közlöny*, 2003, 84, 17-19.

M-Hamvas M., Hergert T., Vasas G., Máthé Cs., <u>Tóth E.</u>, Vígvári T., Bácsi I., Surányi Gy., Borbély Gy. A mikrocisztin-LR és a cilindrospemopszin hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 74-76.

Vasas G., Gáspár A., Tóth Sz., Bácsi I., M-Hamvas M., Máthé Cs., <u>Tóth E.</u>, Surányi Gy., Borbély Gy. Cianobakteriális toxinok (anatoxin-a, cilindrospermopszin, mikrocisztin-LR együttes analízise kapillár elektroforézissel. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 44-45. <u>Tóth E.</u>, Batta Gy., Vasas G., Drahos L., Bácsi I., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., Tóth Sz., Borbély G. Cylindrospermopsicyclin, a new cyanotoxin from Cylindrospermopsis raciborskii BGSD 266 (a Hungarian isolate). *J. Am. Chem. Soc.*, Közlésre előkészítve.

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények:

Vígvári T., M-Hamvas M., Máthé Cs., Vasas G., <u>Tóth E.</u>, Surányi Gy., Bácsi I., Borbély Gy. A fenilalanin-ammónia liáz enzim aktivitásának változása mikrocisztin-LR-el (cianotoxin) kezelt regenerált nád növényekben. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 170-171.

Máthé Cs., M-Hamvas M., Vígvári T., Surányi Gy., Vasas G., Bácsi I., <u>Tóth E.</u>, Borbély Gy. Mikrocisztin-LR-el kezelt, kalluszból regenerált "mini" nádnövények szövettani vizsgálata. *Hidrobiológiai közlöny*, **2003**, 84, 77-78.

Előadások és poszterek:

<u>Tóth E.</u>, **Dinya Z.**, **Antus S.** Izotóp-jelzett pterokarpánok előállítása és tömegspektrometriai vizsgálata. Kossuth Lajos Tudományegyetem Természettudományi Karának Házi Tudományos Diákköri Konferenciája, Debrecen, 1998.04.23-24.

<u>Tóth E.</u>, Dinya Z., Antus S. Izotóp-jelzett pterokarpánok előállítása és tömegspektrometriai vizsgálata. XXIV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kémiai és Vegyipari Szekció, Veszprém, 1999.04.7-9.

<u>Tóth E.</u>, Dinya Z., Antus S. Pterokarpánok tömegspektrometriai vizsgálata. Vegyészkonferencia (MKE), Eger, 1999.06.22-24.

<u>Tóth E.</u>, **Dinya Z.**, **Antus S.** Synthesis of Deuterated Pterocarpans and study of their MS properties. 37th IUPAC Congress and 27th GDCh General Meeting, Berlin, 1999.08.15-19.

<u>Tóth E.</u>, **Dinya Z.**, **Antus S.** Izotóp-jelzett pterokarpánok előállítása és tömegspektrometriai vizsgálata. Eötvös Konferencia, Budapest, 2000.03.25-26.

<u>Tóth E.</u>, **Dinya Z.**, **Jekő J.**, **Antus S.** Mass spectrometric rearrangements and fragmentation pathway of pterocarpan derivatives. 15th International Mass Spectrometry Conference, Barcelona, 2000.08.27-09.01.

<u>Tóth E.</u>, Dinya Z., Antus S., A pterokarpán váz tömegspektrometriai vizsgálata. 44. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Baja, 2001.06.25-27.

<u>Tóth E.</u>, Vasas G., Surányi Gy., Dinya Z., M-Hamvas M., Borbély G. Isolation and characterization of cyanotoxins from cyanobacteria of Kis-Balaton Reservoir origin, Hungary 23rd International Symposium on the Chemistry of Natural Product, Firenze, 2002. 07.28-08.02.

<u>Tóth E.</u>, Vasas G., Surányi Gy., Dinya Z., M-Hamvas M., Máthé Cs., Bácsi I., Borbély Gy. Kis-Balatonból izolált cianobaktériumok mikrocisztin tartalmának meghatározása. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2003.10.01-03.

Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Máthé Cs., <u>Tóth E.</u>, Tóth Sz., Borbély Gy. Az Aphanizomenon ovalisporum cianobaktérium periplazmatikus alkalikus foszfatázának vizsgálata foszforéhezés körülményei között. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2003.10.01-03.

M-Hamvas M., Hergert T., Vasas G., Máthé Cs., <u>Tóth E.</u>, Vígvári T., Bácsi I., Surányi Gy., Borbély Gy. A mikrocisztin-LR és a cilindrospemopszin hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2003.10.01-03.

Vasas G., Gáspár A., Tóth Sz., Bácsi I., M-Hamvas M., Máthé Cs., <u>Tóth E.</u>, Surányi Gy., Borbély Gy. Cianobakteriális toxinok (anatoxin-a, cilindrospermopszin, mikrocisztin-LR együttes analízise kapillár elektroforézissel. *XLIV. Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2003.10.01-03.

<u>Tóth E.</u>, Vasas G., Surányi Gy., M-Hamvas M., Pomogyi P., Borbély Gy. Kis-Balatoni Microcystis fajok cianotoxin tartalmának tömegspektrometriás analízise. *XLIV*. *Hidrobiológus Napok, Tihany*, 2002.10.02-04.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- 1. Bryant D.A. (szerk.) The molecular bilology of Cyanobacteria. *Kluwer Academic Publishers*, *Dordrecht*, 1994, pp879.
- 2. Kiss K.T. Bevezetés az algológiába Elméleti és gyakorlati ismeretek. Egyetemi tankönyv, *ELTE Eötvös Kiadó, Budapest* 1998, 9-48.
- 3. Szentirmai A. A mikrobiológia alapjai. Egyetemi jegyzet, Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen 1996, 182-195.
- Sivonen K., Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I., Bartram J. (eds) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. *E&FN Spon, London and New York* 1999, 41-111.
- 5. Carmichael W.W. The Toxins of Cyanobacteria. Sci. Am. 1994, 270, 78-86.
- 6. Reynolds C.S., Walsby A.E. Water-blooms. *Biol. Rev.* 1975, 50, 437-481.
- 7. Codd G.A Beattie K.A. Cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins: awareness and action in the United Kingdom. *PHLS Microbiology Digest* 82-86
- 8. Hallegraeff G.M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycol. Rev.* **1993**, 32, 79-99.
- Hortobágyi T., Kárpáti I. Nagyméretű vízvirágzás a Balaton délnyugati részén. Botanikai Közlemények 1967, 54, 137-142.
- Padisák, J. Cylindrospermopsis raciborksii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol.* 1998, Suppl. 107, 563-593.
- Carmichael W.W. Cyanobacteria secondary metabolites the cyanotoxins. J. Appl. Biol. 1992, 72, 445-459.
- Azevedo S.M.F.O., Carmichael W.W., Jochimsen E.M., et al. Human intoxication by microcystin during reanal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 2002, 441-446.
- Bourke A.T.C., Hawes R.B., Neilson A., et al. An outbreak of hepato enteritis (the Palm Island mystery diseases) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* 1983, 3, 45-48.
- 14. Lambert T., Holmes C., Hrudey S. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Res.* **1996**, 30, 1411-1422.

- Senogles P., Shaw G., Smith M., et al. Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from Cylindrospermopsis raciborskii, by chlorination. *Toxicon* 2000, 38, 1203-1213.
- Senogles-Derham P.J., Seawright A., Shaw G., et al. Toxicological aspects of treatment to remove cyanobacterial toxins from drinking water determined using the heterozygous P53 transgenic mouse model. *Toxicon* 2003, 41, 979-988.
- Rodríguez E., Sordo A., Metcalf J.S., et al. Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate. *Water Res.* 2007, 41, 2048-2056.
- Senogles P.J., Scott J.A., Shaw G., et al. Photocatalytic degradation of the cyanotoxin cylindrospermopsin, using titanium dioxide and UV irradiation. *Water Res.* 2001, 35, 1245-1255.
- Kubo T., Hosoya K., Watabe Y., et al. Interval immobilization technique for recognition toward a highly hydrophilic cyanobacterium toxin. J. Chromatogr. B – Anal. Techn. Biomed. Life Sci. 2004, 806, 229-235.
- 20. Pearson M.J. (szerk.) Toxic Blue-Green Algae, The Report of the National Rivers Authority. 1990, 11-60.
- Saker M.L., Thomas A.D., Norton J.H. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii in an outback region of north Queensland. *Environ. Toxicol.* 1999, 14, 179-182.
- Bell S.G., Codd G.A. Cyanobacterial toxins and human health. *Rev. Med. Microbiol.* 1994, 5, 256-264.
- 23. Kós P., Gorzó Gy., Surányi Gy., et al. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (Sinapis alba). *Anal. Biochem.* 1995, 225, 49-53.
- Istvánovics V., Somlyódy L., Clement A. Cyanobacteria-mediated internal eutrophication in shallow Lake Balaton after load reduction. *Water Res.* 2002, 36, 3314-3322.
- 25. Vörös L., V.-Balogh K., Koncz E., et al. Phytoplankton and bacterioplankton production in a reed-covered water body. *Aquatic Botany* 2003, 77, 99-110.
- 26. V.-Balogh K., Vörös L. High bacterial production in hypertrophic shallow reservoirs rich in humanic substances. *Hydrobiologia* **1997**, 342/343, 63-70.

- 27. Présing M, V.-Balogh K., Vörös L., et al. Relative nitrogen deficiency without occurrences of nitrogen fixing blue-green algae in a hypertropic reservoir. *Hydrobiologia* **1997**, 342/343, 55-61.
- **28.** Kovács A.W., Koncz E., Vörös L. Akinete abundance of N₂-fixing cyanobacteria in sediment of Lake Balaton (Hungary). *Hydrobiologia* **2003**, 506-509, 181-188.
- 29. Presing M., Herodek S., Vörös L., et al. Nitrogen fixation, ammonium and nitrate uptake during a bloom of Cylindrospermosis raciborskii in Lake Balaton. *Arhiv für Hydrobiologie* 1996, 136, 553-562.
- Kiss T., Vehovszky A., Hiripi L., et al. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii, on identified molluscan neurones. *Comp. Biochem. Phys. C* 2002, 131, 167-176.
- **31.** Castro D., Vera D., Lagos N., et al. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii C10. *Toxicon* **2004**, 44, 483-489.
- **32.** Molica R., Onodera H., Garcia C., et al. Toxins in the freshwater cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycol.* **2002**, 41, 606-611.
- **33.** Lagos N., Onodera H., Zagatto P.A., et al. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii, isolated from Brazil. *Toxicon* **1999**, 37, 1359-1373.
- 34. Abe T., Lawson T., Weyers J.D.B., et al. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of Phaseolus vulgaris primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytol.* 1996, 133, 651-658.
- **35.** Liu B.H., Yu F.Y., Huang X., et al. Monitoring of microcystin-protein phosphatase adduct formation with immunochemical methods. *Toxicon* **2000**, 38, 619-632.
- Kurki-Helasmo K., Meriluoto J. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (Sinapis alba L.) seedlings. *Toxicon* 1998, 36, 1921-1926.
- **37.** MacKintosh C., Beattie K.A., Klumpp S., et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* **1990**, 264, 187-192.
- **38.** MacKintosh C., Cohen P. Identification of high levels of type 1 and 2A protein phosphatases in higher plants. *Biochem. J.* **1989**, 262, 335-339.

- **39.** Shen X.Y., Lam P.K.S., Shaw G.R., et al. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* **2002**, 40, 1499-1501.
- 40. Falconer I.R., Hardy S.J., Humpage A.R., et al. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) Cylindrospermopsis raciborskii in male Swiss albino mice. *Environ. Toxicol.* 1999, 14, 143-150.
- 41. Hawkins P.R., Runnegar M.T.C., Jackson A.R.B., et al. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green-alga) Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water-supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, 50, 1292-1295.
- **42.** Harada K., Kondo F., Lawton L. Laboratory analysis of cyanotoxins in toxic cyanobacteria water. In: Chorus I., Bartram J. (eds) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. *E&FN Spon, London and New York* **1999**, 369-405.
- Metcalf J.S., Bell S.G., Codd A. Colorimetric Immuno-protein Phosphatase Inhibition Assay for Specific Detection of Microcystins and Nodularins of Cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 904-909.
- 44. Kós P. A Microcystis aeruginosa toxintermelése. 1995, Doktori értekezés, JATE, Szeged.
- **45.** Vasas G., Gáspár A., Surányi Gy., et al. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from Aphanizomenon ovalisporum, by plant test (Blue-Green Sinapis Test). *Anal. Biochem.* **2002**, 302, 95-103.
- **46.** Metcalf J.S., Beattie K.A., Saker M.L., et al. Effects of organic solvents on the high performance liquid chromatographic analysis of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin and its recovery from environmental eutrophic waters by solid phase extraction. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, 216, 159-164.
- **47.** Welker M., Bickel H., Fastner J. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin opportunities and limits. *Water Res.* **2002**, 36, 4659-4663.
- **48.** Leano J.M., Gago A., Rodríguez-Vázquez J.A., et al. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography procedures for the analysis of paralytic shellfish toxins. *J. Chromatogr. A* **1998**, 798, 131-136.
- **49.** James K.J., Furey A., Sherlock I.R., at al. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatograpy with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, 798, 147-157.

- **50.** Kubo T., Sano T., Hosoya K., et al. A new simply and effective fractionation method for cylindrospermopsin analyses. *Toxicon* **2005**, 46, 104-107.
- Kikuchi S., Kubo T., Kaya K. Cylindrospermopsin determination using 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) as the internal standard. *Anal. Chim. Acta* 2007, 583, 124-127.
- **52.** Stirling D.J., Quilliam M.A. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand. *Toxicon* **2001**, 39, 1219-1222.
- Dell'Aversano C., Eaglesham G.K., Quilliam M.A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2004, 1028, 155-164.
- Onyewuenyi N., Hawkins P. Separations of toxic peptides (microcystins) in capillary electrophoresis, with the aid of organic mobile phase modifiers. *J. Chromatogr. A* 1997, 749, 271-277.
- 55. Thibault P., Pleasance S., Laycock M.V. Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. 1991, 542, 483-501.
- Vasas G., Szydlowska D., Gáspár A., et al. Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. J. Biochem. Biophys. Methods 2006, 66, 87-97.
- 57. Vasas G., Gáspár A., Práger Cs., et al. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2004, 25, 108-115.
- **58.** Pelander A., Ojanpera I., Sivonen K., et al. Screening for cyanobacterial toxins in bloom and strain samples by thin layer chromatography. *Water Res.* **1996**, 30, 1464-1470.
- **59.** Pelander A., Ojanpera I., Lahti K., et al. Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis. *Water Res.* **2000**, 34, 2643-2652.
- 60. Papp E., H-Otta K., Záray Gy., et al. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal* 2002, 73, 39-43.
- Wilson K.M., Schembri M.A., Baker P.D., et al. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii and design of a species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 332-338.

- Dyble J., Paerl H.W., Neilan B.A. Genetic characterization of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on nifH and cpcBA-IGS nucleotide sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2567-2571.
- **63.** Li R., Carmichael W.W., Brittain S., et al. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria). *Toxicon* **2001**, 39, 973-980.
- 64. Chonudomkul D., Yongmanitchai W., Theeragool G., et al. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of Cylindrospermopsis raciborskii (nostocales, cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004, 48, 345-355.
- 65. Valerio E., Pereira P., Saker M.L., et al. Molecular characterization of Cylindrospermopsis raciborskii strains isolated from Portuguese freshwaters. *Harmful Algae* 2005, 4, 1044-1052.
- Gugger M., Molica R., Le Berre B., et al. Genetic diversity of Cylindrospermopsis strains (Canobacteria) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 1097-1100.
- 67. Saker M.L., Griffiths D.J. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycol.* 2000, 39, 349-354.
- Baker R., Teltsch B., Sukenik A., et al. 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum from Lake Kinneret, Israel. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 387-389.
- 69. Norris R.L., Eaglesham G.K., Pierens G., et al. Dezoxycylindrospermopsin, an Analog of Cylindrospermopsin from Cylindrospermopsis raciborskii. *Environ. Toxicol.* 1999, 14, 163-165.
- 70. Pomati F., Moffitt M.C., Cavaliere R., et al. Evidence for differences in the metabolism of saxitoxin and C1+2 toxins in the freshwater cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii T3. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2004, 1674, 60-67.
- **71.** Fastner J., Heinze R., Humpage A.R., et al. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* **2003**, 42, 313-321.

- 72. Saker M.L., Nogueira I.C.G., Vasconcelos V.M., et al. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 2003, 55, 243-250.
- **73.** Mischke U. Cyanobacteria associations in shallow polytrophic lakes: influence of environmental factors. *Acta Oecol.* **2003**, 24, S11-S23.
- 74. Briand J.F., Robillot C., Quiblier-Llobéras C., et al Environmental context of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobateria) blooms in a shallow pond in France. *Water Res.* 2002, 36, 3183-3192.
- Seawright A.A., Nolan C.C., Shaw G.R., et al. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska). *Environ. Toxicol.* 1999, 14, 135-142.
- 76. Eaglesham G.K., Norris R.L., Shaw G.R., et al. Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environ. Toxicol.* 1999, 14, 151-154.
- 77. Shaw G.R., Sukenik A., Livne A., et al. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, Aphanizomenon ovalisporum (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ. Toxicol.* 1999, 14, 167-177.
- Banker R., Carmeli S., Hadas O., et al. Identification of cylindrospermopsin in Aphanizomenon ovalisporum (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J. Phycol.* 1997, 33, 613-616.
- **79.** Preussel K., Stuken A., Wiedner C., et al. First report on cylindrospermopsin producing Aphanizomenon flos-aquae (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* **2006**, 47, 156-162.
- Underdal B., Nordstoga K., Skulberg O.M. Protracted toxic effects caused by saline extracts of Aphanizomenon flos-aquae (Cyanophyceae/Cyanobacteria). *Aquatic Toxicol.* 1999, 46, 269-278.
- Li R.H., Carmichael W.W., Brittain S., et al. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from Raphidiopsis curvata (Cyantobacteria). J. Phycol. 2001, 37, 1121-1126.
- 82. Seifert M., McGregor G., Eaglesham G., et al. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermop sin by the freshwater benthic cyanobacterium, Lyngbya wollei (Farlow ex Gornont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 2007, 6, 73-80.

- **83.** Harada K., Ohtani I., Iwamoto K., et al. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium Umezakia natans and its screening method. *Toxicon* **1994**, 32, 73-84.
- 84. Shalev-Alon G., Sukenik A., Livnah O., et al. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 209, 87-91.
- **85.** Looper R.E., Runnegar M.T.C., Williams R.M. Syntheses of the cylindrospermopsin alkaloids. *Tetrahedron* **2006**, 62, 4549-4562.
- Looper R.E., Williams R.M. Construction of the A-ring of cylindrospermopsin via an intramolecular oxazinone-*N*-oxide dipolar cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 769-771
- 87. Keen S.P., Weinreb S.M. Studies on total synthesis of cylindrospermopsin: new constructions of uracils from α,β -unsaturated esters. *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 4307-4310.
- **88.** McAlpine I.J., Armstrong R.W. Stereoselective synthesis of a tricyclic guanidinium model of cylindrospermopsin. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1849-1853.
- **89.** Snider B.B., Xie C.Y. Model studies for the synthesis of the marine hepatotoxin cylindrospermopsin. Preparation of a bicyclic guanidine with the hydroxymethyluracil side chain. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7021-7024.
- **90.** Snider B.B., Harvey T.C. Synthesis of a bicyclic model for the marine hepatotoxin cylindrospermopsin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4587-4590.
- **91.** White J.D., Hansen J.D. Total synthesis of (–)-7-epicylindrospermopsin, a toxic metabolite of the freshwater cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum, and assignment of its absolute configuration. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1963-1977.
- 92. Burgoyne D.L., Hemscheidt T.K., Moore R.E., et al. Biosynthesis of cylindrospermopsin. J. Org. Chem. 2000, 65, 152-156.
- **93.** Hawkins P.R., Chandrasena N.R., Jones G.J., et al. Isolation and toxicity of Cylindrospermopsis raciborskii from an ornamental lake. *Toxicon* 35, 341-346.
- **94.** Chiswell R.K., Shaw G.R., Eaglesham G., et al. Stability of Cylindrospermopsin, the Toxin from the Cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii: Effect of pH, Temperature, and Sunlight on Decomposition. *Environ. Toxicol.* **1999**, 14, 155-161.
- 95. Ohtani I., Moore R.E., Runnegar M.T.C. Cylindrospermopsin a potent hepatotoxin from the blue-green-alga Cylindrospermopsis raciborskii. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 7941-7942.

- **96.** Saker M.L., Eaglesham G.K. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii in tissues of the Redclaw crayfish Cherax quandricarinatus. *Toxicon* **1999**, 37, 1065-1077.
- 97. Humpage, A.R., Fenech M., Thomas P., et al. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mut. Res. – Gen. Tox. En.* 2000, 472, 155-161.
- **98.** Terao K, Ohmori S, Igarashi K, et al. Electron-microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green-alga Umezakia natans. *Toxicon* **1994**, 32, 833-843.
- **99.** Metcalf J.S., Barakate A., Codd G.A. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, 235, 125-129.
- 100. Runnegar M.T., Kong S.M., Zhong Y.Z., et al. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 201, 235-241.
- 101. Reisner M., Carmeli S., Werman M., et al. The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. *Toxicol. Sci.* 2004, 82, 620-627.
- 102. Chong M.W.K., Wong B.S.F., Lam P.K.S., et al. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* 2002, 40, 205-211.
- **103.** Bishop C.T., Anet E.F.L.J., Gorham P.R. Isolation and identification of the fast-death factor in Microcystis aeruginosa NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 453-471.
- 104. Rinehart K.L., Harada K.-I., Namikoshi M., et al. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 8557-8558.
- **105.** Namikoshi M., Rinehart K.L., Dahlem A.M. Total synthesis of Adda, the unique C₂₀ amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4349-4352.
- **106.** Goldberg J., Huang H., Kwon Y., et al. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* **1995**, 376, 745-753.
- 107. Barford D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 1996, 21, 407-412.

- 108. Carmichael W.W., Eschedor J.T., Patterson G.M.L., et al. Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium Nodularia spumigena Mertens emend. L575 from New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54, 2257-2263.
- 109. Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by Oscillatoria agardhii strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 2658-2666.
- 110. Orr. P.T., Jones G.J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited Microcystis aeruginosa cultures. *Limnol. Oceanogr.* 1998, 43, 1604-1614.
- 111. Oh H.-M., Lee S.J., Jang M.-H., et al. Microcystin production by Microcystis aeruginosa in a phosphorus-limited chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 176-179.
- 112. Utkilen H., Gjolme N. Iron-stimulated toxin production in Microcystis aeruginosa. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 797-800.
- 113. Bácsi I., Vasas G., Surányi Gy., et al. Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 259, 303-310.
- 114. Geissman T.A. (szerk.) The Chemistry of Flavanoid Compounds. Pergamon Press, Oxford, 1962.
- 115. Perrin D.R., Bottomley W. Studies on Phytoalexins. V. The Structure of Pisatin from Pisum sativum L. J. Am. Chem. Soc. 1962, 84, 1919-1922.
- **116.** Nakagawa M., Nakanishi K., Darko L.L., et al. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 3855-3858.
- 117. Engler T.A., Lynch K.O., Reddy I.P., et al. Synthetic Pterocarpans with anti-HIV Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993, 3, 1229-1232.
- 118. Selvam C., Jachak S.M., Oil R.G., at al. A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from Indigofera aspalathoides: structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking. *Tetrahedron Lett.* 2004, 45, 4311-4314.
- 119. Silva A.J.M., Coelho A.L., Simas A.B.C., et al. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpans against snake venom. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 431-435.

- 120. Militao G.C.G., Datans I.N.F., Pessoa C., et al. Induction of apoptosis by pterocarpans from Platymiscium Floribundum in HL-60 human leukemia cells. *Life Sciences* 2006, 78, 2409-2417.
- 121. Trudell, J.R., Woodgate S.D., Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems – CLXXXVII. A study of skeletal rearrangements in chromans by combined ¹³C and deuterium labeling. Org. Mass Spectrom. 1970, 3, 753-776.
- 122. Komárek J., Anagnostidis K. Modern approach to the classification of the Cyanophytes 1-5. *Arch. Hydrobiol.* 1985, Suppl. 82, 247-345; 1986, Suppl. 73, 157-226; 1988, Suppl. 80, 327-472; 1989, Suppl. 82, 247-345; 1990, Suppl. 59, 1-73.
- 123. Vasas G. A cianobakteriális toxintermelés vizsgálata cilindrospermopszin-termelő szervezeteken. Doktori értekezés. *Debreceni Egyetem* 2002.
- 124. Allen M.M. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates.*J. Phycol.* 1968, 4, 1-4.
- 125. M-Hamvas M. A mikrocisztinek (cianotoxinok) hajtásos növényekre gyakorolt hatásainak vizsgálata mustár (Sinapis alba L.) tesztnövényeken. Doktori értekezés. Debreceni Egyetem 2001.
- 126. Bendall S.G., Bowes, J.M., Stewart A.Q.C., et al. Oxygen-evolving Photosystem II particles from Phormidium laminosum. In: Packer L., Glazer A.N. (eds) Cyanobacteria. Methods in Enzimology. *Academic Press, Inc.* 1988, 167.
- 127. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- Derome A.E. Modern NMR Techniques for Chemistry Research. (Tetrahedron Organic Chemistry Series, vol. 6) *Pergamon Press* 1987.
- Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- 130. Gersten D.M., Gabriel O. Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis II.
 Enzymes modifying nucleic acids. *Anal. Biochem.* 1992, 203, 181-186.
- **131.** Schlereth A., Becker C., Horstmann C., et al. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (Vicia sativa L.). *J. Exp. Bot.* **2000**, 51, 1423-1433.
- 132. Suginome H., Iwadare T. The Synthesis of *d*,*l*-Homopterocarpin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1966, 39, 1535-1541.
- 133. Felföldy L. A kékalgák (Cyanophyta) kishatározója. Vízügyi hidrobiológia 1. 1972.

- 134. Komárek J., Anagnostidis K. Modern approach to the classification of the Cyanophytes 1-5. *Arch. Hydrobiol.* 1985, Suppl. 82, 247-345; 1986, Suppl. 73, 157-226; 1988, Suppl. 80, 327-472; 1989, Suppl. 82, 247-345; 1990, Suppl. 59, 1-73.
- 135. Middleditch B.S., Macnicol D.D. Mass-spectra of some chromans. Org. Mass Spectrom. 1976, 11, 212-216.
- **136.** Pelter A., Stainton M.B. The Mass Spectra of Oxygen Heterocycles. II. The Mass Spectra of Some Flavonoids. *J. Het. Chem.* **1965**, 2, 262-271.
- 137. Sanduja S.K., Kukla A.S. Indian J. Chem. B 1979, 17, 639-641.
- **138.** Mizonu M., Tanaka T., Katsuragawa M., et al. A New Pterocarpan from the Heartwood of Cladrastis platycarpa. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 498-499.