

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Mikroorganizmusok életfolyamatainak molekuláris analízise c. program

## *Schizosaccharomyces pombe* törzsek vizsgálata molekuláris módszerekkel **Cd<sup>2+</sup> stresszhatás alatt**

PhD értekezés tézisei

**Takács Krisztina**

Témavezető:  
**Prof. Dr. Pesti Miklós**  
egyetemi tanár

**PÉCS, 2008**

## BEVEZETÉS

A világ minden pontját érintő iparosodás előrehaladásával párhuzamosan növekedik a különféle környezetszennyező anyagok kibocsátása. Az egyik legjelentősebb környezeti terheléssel bíró káros anyagok csoportja, mely ipari melléktermékként keletkezik és kerül nagy mennyiségben a természetbe, a nehézfémek. A biológiai körforgalomba bejutva a nehézfémek a talajból a növényekbe bekerülve, a táplálékláncon keresztül eljuthatnak az emberhez, s a szervezetben felhalmozódó fémek súlyosan veszélyeztetik az egészséget.

A sejteket érő biotikus és abiotikus hatásokat, melyekre a sejt megváltozott biokémiai és genetikai működéssel ún. válaszreakciókkal reagál, stresszhatásoknak nevezzük. Bizonyos határok között a sejtek a megváltozott környezeti stresszhez adaptálódni tudnak azáltal, hogy életfolyamataikat megváltoztatják úgy, hogy sikeresen kivédjék az őket ért káros tényezőket. A nehézfém-stressz alatt lejátszódó válaszreakciók vizsgálata pedig az utóbbi időben, a szennyezett talajok és vizek rekultivációja miatt hódít teret. A magasabbrendű organizmusok tanulmányozása gyakran lassú, nehézkes és igen költséges folyamat. A kutatók ezért egyszerűbb felépítésű, eukarióta mikroorganizmusokat választanak kutatásuk célpontjával, melyek működése igen hasonlít a magasabbrendű eukarióta sejtekhez. Ezek közé az ún. modellorganizmusok közé tartozik a *Schizosaccharomyces pombe* is.

A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád az eukarióta sejtekben evolúciósan konzervált jelátviteli mechanizmus, melynek elsődleges feladata, hogy a környezetből a sejtet érő különféle stimulusokra válaszreakciókat közvetítsen, illetve létrehozson. A MAPK kaszkád után a jelátviteli útvonal következő tagjai a transzkripciós faktorok, melyek képesek aktiválódásuk után a sejtmagba lépni, majd bizonyos géneket indukálni. A Pap1 transzkripciós faktor a Wis1 (MAPKK), Sty1 (MAPK) útvonalon keresztül aktiválódik különböző stresszhatásokra és számos gén expresszióját szabályozza a stressz-válasz során. A Pap1 sejtmagi lokalizálódását elsősorban oxidatív stressz esetén figyelték meg.

A  $\text{Cd}^{2+}$ -al szembeni védekező mechanizmusokat három csoportba sorolhatjuk: i) a glutation és a kén anyagcsere; ii) kadmium kompartmentalizáció; iii) reaktív oxigén gyökök detoxifikációja. A kénanyagcsere folyamatok során glutation (GSH) képződik a sejtekben, mely központi szerepet játszik mind a  $\text{Cd}^{2+}$  lekötésében, mind a keletkezett reaktív oxigén formák semlegesítésében. Az élesztő sejtekben a glutation S-transzferáz enzim működésével a intracelluláris  $\text{Cd}^{2+}$  a glutationhoz kötődik. A reaktív oxigén formák semlegesítésében a szuperoxid dizmutázok, peroxidázok, a kataláz és a glutation működése fontos. A három folyamatrendszer több ponton áll kapcsolatban egymással, ezáltal abnormális működésük hatással van a  $\text{Cd}^{2+}$  detoxifikációra.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. A *S. pombe* Cr(VI) toleráns és a szülői törzs Cd<sup>2+</sup> érzékenységének vizsgálata és a reaktív szabadgyökök eliminációjában résztvevő glutation S-transzferáz (GST) és totál szuperoxid dizmutáz (SOD) specifikus enzimaktivitás meghatározása.
2. *S. pombe* jelátviteli és transzkripció faktor mutáns törzsek érzékenységének vizsgálata különféle stresszor anyagok esetében és a minimális gátló koncentráció meghatározása. A kísérletek során nehézfém érzékeny törzsek keresése.
3. A *Δpap1* transzkripció faktor mutáns törzs Cd<sup>2+</sup> érzékenységének feltárása, a jelátviteli folyamatok tanulmányozása Cd<sup>2+</sup> stressz alatt és a Cd<sup>2+</sup> hatásmechanizmusának illetve a sejt detoxifikációs folyamatainak vizsgálata különféle módszerekkel.  
A vad-típusú és a *Δpap1* mutáns törzsek esetében:
  - a Cd<sup>2+</sup> akkumuláció meghatározása,
  - a Cd<sup>2+</sup> által a sejtben generált szabadgyökök keletkezésének vizsgálata,
  - a sejt reaktív oxigén gyökökkel (ROS) szembeni védekező mechanizmusainak jellemzése, különös tekintettel bizonyos enzimek aktivitás-vizsgálatára és az antioxidáns hatással bíró glutation szint mérésére,
  - a Cd<sup>2+</sup> stressz alatt lezajló gén indukció/represszió tanulmányozása molekuláris biológiai technikákkal.

## ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Munkánk során az alábbi törzsekkel dolgoztunk.

I) *Schizosaccharomyces pombe* Cr(VI) toleráns törzsét (*chr1-66T*) tanszékünkön állították elő indukált mutagenezissel a *6chr<sup>+</sup>* auxotróf szülői törzsből.

II) *Schizosaccharomyces pombe* szülői törzsből származó MAPK és transzkripció faktor deléciós mutáns törzsek:

- *Δwis1*, *Δstyl*, *Δatf1*, *Δsin1*, *Δpap1*, illetve a vad-típusú.

### I. Cr(VI) toleráns törzs vizsgálata

- A túlélési görbe meghatározása Cd<sup>2+</sup> kezelésnél telepszámlálással történt.
- A specifikus szuperoxid-dizmutáz, glutation S-transzferáz enzimaktivitás meghatározása spektrofotometriásan, „rate assay” módszerrel történt.

### II. MAPK és transzkripció faktor mutáns törzsek vizsgálata

- Minimális gátló koncentráció meghatározását feltöltéssel végeztük.
- Láng atom abszorpciós spektrometriával határoztuk meg a sejtek Cd<sup>2+</sup> felvételét.
- A szuperoxid tartalom mérésénél a dihidroetídium átalakulását etídiummá fluoriméterrel detektáltuk.
- A peroxid mennyiségének meghatározását a sejtekben dihidrorodamin 123-al végeztük áramlási citométer segítségével.
- A specifikus szuperoxid-dizmutáz, glutation S-transzferáz enzimaktivitás és a GSH, GSSG mennyiségének illetve a GSH/GSSG arányának meghatározása spektrofotometriásan, „rate assay” módszerrel történt.
- Az RNS analízisét reverz-transzkriptáz PCR-al és Northern blottal végeztük.

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

I. Megvizsgáltuk a *S. pombe* Cr(VI) toleráns és a szülői törzs Cd<sup>2+</sup> érzékenységét, s megállapítottuk, hogy a Cr(VI) toleráns törzs Cd<sup>2+</sup> szenzitivitásában és a Cr(VI) toleráns fenotípus kialakításában nem játszik szerepet a glutation S-transzferáz enzimaktivitás és az összes szuperoxid dizmutáz enzimaktivitás. A további kísérletek bizonyították, hogy a létrejött fenotípus háttérében a GSH alacsony szintje, a sejt lecsökkent redukáló kapacitása és az alacsony <sup>•</sup>OH koncentráció áll.

II. Munkánk során *S. pombe* MAPK jelátviteli rendszer deléciós mutáns, transzkripciós faktor deléciós mutáns törzsek és egy vad-típusú törzs stresszor érzékenységét vizsgáltuk. Foltoltás technikával meghatároztuk a törzsek minimális gátló koncentrációját oxidatív és nehézfém stresszor anyagokkal szemben. A MAPK mutánsok közül a *Δwis1* és a *Δstyl* mutánsnál alacsony minimális gátló koncentrációt határoztunk meg; transzkripciós faktor szinten a *Δpap1* mutáns bizonyult a legérzékenyebbnek Cd<sup>2+</sup>-mal szemben. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a Cd<sup>2+</sup> stressz során lejátszódó folyamatok a Wis1-Styl SAPK útvonalon keresztül, a Pap1 transzkripciós faktor által szabályozódnak. Munkánkat a továbbiakban két törzssel folytattuk, a vad-típusúval és a *Δpap1* mutánsal, hogy feltárjuk a mutáns törzs Cd<sup>2+</sup> szenzitív fenotípusának háttérét.

Láng atom abszorpciós spektrometriával meghatároztuk a sejtek Cd<sup>2+</sup>-tartalmát a 0, 30, 60, 120 és 240 perces mintáknál és megállapítottuk, hogy a két törzs Cd<sup>2+</sup> tartalma között nincs szignifikáns különbség. A további vizsgálatok eredményeit illetve a *Δpap1* mutáns Cd<sup>2+</sup> érzékenységét tehát nem a törzsek eltérő nehézfém-felvétele és intracelluláris koncentrációja okozza.

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a Cd<sup>2+</sup> kezelés hatására keletkeznek-e szabadgyökök a sejtben. Azt tapasztaltuk, hogy már a kezelés nélküli állapotban is magasabb szuperoxid tartalom mérhető a *Δpap1* mutáns törzsben a vad-típusúhoz képest. Továbbá megállapítottuk, hogy a hosszú időtartamú Cd<sup>2+</sup> kezelés hatására a sejtekben megnő a szuperoxid gyök koncentrációja, ami oxidatív stresszre utal.

Elvégeztük egy másik szabadgyök – a peroxid - mennyiségének a vizsgálatát is és ezzel szintén alátámasztottuk a szuperoxid mérés eredményeit, miszerint a Cd<sup>2+</sup> kezelés képes szabad gyököket generálni és ezáltal oxidatív stresszt létrehozni a sejtekben.

Kísérleteink sorát enzimaktivitás mérésekkel folytattuk. Megállapítottuk, hogy a *Δpap1* törzsben már alapállapotban is alacsonyabb a totál SOD enzimaktivitás, s hosszú időtartamú Cd<sup>2+</sup> kezelés hatására pedig a különbség jelentősen nő. Az összes SOD aktivitás

szignifikánsan alacsonyabb a *Δpap1* törzsben, mint a vad-típusú törzsben, ami arra enged következtetni, hogy a Pap1 fehérjének szerepe van abban, hogy a Cu,Zn-SOD és/vagy a Mn-SOD megfelelő aktivitást mutasson a stressz-válasz folyamatok alatt. A SOD enzimaktivitás indukciója tehát Pap1 függő. A CdP<sup>+</sup> kezelés alatt mért magas szuperoxid anion koncentráció a *Δpap1* törzsben szintén azt támasztotta alá, hogy a mutáns sejtekben a SOD aktivitás a Pap1 hiánya miatt nem megfelelő és így a szuperoxid nem képes dizmutálódni hidrogén-peroxidra és oxigénre.

A SOD-ok mellett a GST-ok is jelentős szereppel bírnak a xenobiotikumok közömbösítésében. A kezelés nélkül mért alacsony GST aktivitás a mutánsban annak tulajdonítható, hogy a benne egyedül termelődő GST III nem képes a hiányzó GST I és GST II hiányát pótolni. A vad-típusú törzs esetében Cd<sup>2+</sup> kezelés hatására nem történt változás a GST aktivitásában, ami azzal magyarázható, hogy a GST szubsztrátja a GSH folyamatosan termelődik és pótlódik a normálisan lezajló szulfát asszimiláció során. A mutánsban azonban Cd<sup>2+</sup> kezelés hatására tovább csökkent a GST specifikus enzimaktivitás, ami annak köszönhető, hogy a mutánsban csak a GST III működik, azonban aktivitása nem elegendő ahhoz, hogy pótolja a másik két GST hatását és ezáltal kevesebb Cd<sup>2+</sup> semlegesítődik.

A GSH mennyisége a *Δpap1* törzsben szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a vad típusú-törzshöz képest. A GSSG koncentrációban illetve a GSH/GSSG arányában nem volt szignifikáns különbség. A GSH mérés alátámasztotta elméletünket, miszerint a *Δpap1* mutánsban kevés a rendelkezésre álló GSH, ami problémát okoz a detoxifikációs folyamatokban. A mutáns csökkent GSH tartalmát a szulfát asszimilációs rendszer és a GR nem megfelelő működése magyarázza.

A folyamatok háttérben zajló molekuláris szabályozó mechanizmusok feltárása érdekében a Cd<sup>2+</sup> detoxifikáció szempontjából fontos gének expresszióját elemeztük RT-PCR és Northern blot technikával. Az RT-PCR reakciókban 12 gén (*gpx1*, *gsh2*, *gst2*, *hmt1*, *hmt1*, *sod1*, *sod2*, *SPAC3H1.10*, *SPCC965.06.1*, *SPCC794.01*, *SPAC3C7.13*, *trx2*) expresszióját néztük. Megállapítottuk, hogy hosszú időtartamú Cd<sup>2+</sup> kezelés hatására a *gst2* kivételével az összes vizsgált gén expresszálódik mindkét törzsben, tehát ezen gének függetlenül expresszálódnak a Pap1-től. A vizsgált gének közül kettőről, az *SPAC3H1.10* (PCS) és az *SPCC749.01* (feltételezett glükóz-6-foszfát 1-dehidrogenáz) elsőként közöltünk expressziós profilt mindkét törzs esetén.

Az RT-PCR vizsgálatunkat kiegészítettük a továbbiakban Northern blot analízissel. Nyolc génről (*gpx1*, *gst2*, *hmt1*, *hmt2*, *sod1*, *sod2*, *SPCC965.06.1*, *trx2*) kaptunk kiértékelhető eredményt, míg három gén esetében (*SPAC3C.13*, *SPAC3H1.10*, *SPCC794.01*) nem tapasztaltunk detektálható jelet. Megállapítottuk, hogy a *gst2* teljes mértékben Pap1 függő,

expressziója azonban nem változik a kezelés alatt a vad-típusú törzsből. A *gpx1 hmt2, sod1, sod2* és *trx1* gének expressziója nem változott  $\text{Cd}^{2+}$  kezelés alatt. Eredményeink megfelelnek a Sanger Institute DNS microarray adatainak illetve kiegészítik azokat a hosszú idejű  $\text{Cd}^{2+}$  kezelés (0-240 perc) alatti expressziós profilokkal a vad-típusú törzsnél, illetve a *Δpap1* mutáns esetén pedig elsőként vizsgáltuk az adott gének kifejeződését nehézfém-stressz során.

Változást tapasztaltunk 2 gén expressziójában a kezelési idő során. Az *SPCC965.06* (feltételezett  $\text{K}^+$  csatorna alegység)gén expressziója mindkét törzsből indukálódik  $\text{Cd}^{2+}$  kezelés hatására, s megállapítható, hogy független a Pap1-től, s nem játszik szerepet a törzs  $\text{Cd}^{2+}$  érzékenységében. A *hmt1* (ABC-típusú vakuoláris transzporter fehérje) expressziója csökkent mindkét törzsből a hosszú időtartamú  $\text{Cd}^{2+}$  kezelés alatt. A Northern analízisek során a Cu,Zn-SOD (*sod1*) és Mn-SOD (*sod2*) esetében kapott expressziós profilok fontos szabályozási folyamatokra mutatnak rá azáltal, hogy a mRNS mennyisége egyik törzsből sem változott a 240 perces  $\text{Cd}^{2+}$  kezelés alatt, míg a specifikus SOD enzimaktivitások jelentősen eltérőek a két törzsnél. Eredményeink azt mutatják, hogy a Pap1 fehérje hatással van a SOD enzimaktivitásra, de hatását nem közvetlenül transzkripció faktoroként a SOD gének expressziójának szabályozásában tölti be, hanem poszt-transzkripcionális és/vagy poszt-transzlacionális indukciós folyamat során képes az enzim aktivitását befolyásolni vagy más gének expresszióját módosítja, melyek hatással lehetnek a SOD enzimek aktivitására.

Összefoglalva munkánk eredményeit a következő megállapításokat tehetjük. A *Δpap1* mutáns a vad-típusú törzssel megegyező mértékben akumulálja a  $\text{Cd}^{2+}$ -ot, azonban a mutáns törzs nem képes kiküszöbölni az intracelluláris  $\text{Cd}^{2+}$  által generált ROS-kat és a  $\text{Cd}^{2+}$  sejtkárosító hatásait. A keletkező ROS-ok semlegesítésére a SOD enzimeknek kellene működésbe lépniük, a mutánsban azonban a Pap1 hiánya miatt az enzimek aktivációja nem megfelelő. Az alacsony aktivitás miatt a keletkezett szuperoxid nem alakul tovább a mutánsban, tovább károsítva ezáltal a sejtet. A Pap1 azonban nem a SOD gének expresszióját szabályozza, hanem vagy közvetett módon például más gének expresszióját befolyásolva, vagy más faktorokon keresztül fejt ki hatását. A SOD-ok elégtelen működése valószínűsíthetően hatással van a kénanyagcserére. Az abnormálisan lezajló szulfát asszimiláció és az alacsony GSH és következtében a *Δpap1* mutánsban csökkent GST aktivitás mutatható ki, ezáltal pedig a  $\text{Cd}^{2+}$  lekötése a GST katalizálásával nem működik a megfelelő hatékonysággal. Másrészt a GSH hiánya miatt a keletkezett ROS-ok sem semlegesítődnek illetve valószínűleg a  $\text{Cd}^{2+}$  kompartmentalizációs folyamatok is sérülnek. Eredményeinkből következik tehát, hogy a Pap1 fehérje hiánya több, a  $\text{Cd}^{2+}$  detoxifikációban résztvevő folyamatrendszer működését befolyásolja negatív módon és ezáltal a *Δpap1* törzsnél  $\text{Cd}^{2+}$  szenzitív fenotípust okoz.

## PUBLIKÁCIÓK

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Takács, K.,** Gazdag, Z., Raspor, P., Pesti, M. (2007): Gene expressions and enzyme analyses in the *Schizosaccharomyces pombe*  $\Delta pap1$  transcription factor mutant exposed to  $Cd^{2+}$ . *J. Basic Microbiol.* 47(4):74-83.

Gazdag, Z., Pócsi, I., Belágyi, J., Emri, T., Blaskó, Á., **Takács, K.** and Pesti, M. (2003): Chromate tolerance caused by reduced hydroxyl radical production and decreased glutathione reductase activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Basic Microbiol.*, 43: 96-103.

### Az értekezés alapjául szolgáló poszterek, előadások:

**Takács, K.,** Blaskó, Á., Gazdag, Z., Pesti, M. (2002): *Schizosaccharomyces pombe* jelátviteli mutánsainak nehézfém és oxidatív stressz érzékenysége. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi Nagygyűlése Balatonfüred, Hungary, pp. 19.

**Takács K.,** Pesti M. (2004): *Schizosaccharomyces pombe*  $\Delta pap1$  jelátviteli mutánsának génexpressziós vizsgálatai kadmium kezelés hatására. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése. Keszthely, Hungary

**Takács, K.,** Pesti, M. (2005): Gene expressions in *Schizosaccharomyces pombe*  $\Delta pap1$  signal transduction mutant exposed to cadmium. 33<sup>th</sup> Annual Conference On Yeasts, Smolenice, Slovakia

### Egyéb tudományos közlemények:

Gyetvai, Á., Emri, T., **Takács, K.,** Dergez, T., Fekete, A., Pesti, M., Pócsi, I. Lenkey, B. (2006): Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS Yeast Res.*, 6(8):1140-8.



### **Egyéb poszterek, előadások:**

Gazdag, Z., Farkas, N., Belágyi, J., Papp, G., Rácz, T., **Takács, K.** and Pesti, M. (2003): Altered cadmium sensitivity of respiratory-deficient *Schizosaccharomyces pombe* mutant. 14<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary

Pesti, M., Gazdag, Z., **Takács, K.**, Czakó-Vér, K., Koósz, Zs., Antal, J., Rácz, T. (2004): A krómvegyületek hatásmechanizmusa élesztősejteken. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése. Keszthely, Hungary

Czéh, Á., Gazdag, Z., Vér, Cs., Rudolf, P., Kulik, Z., Nagy, K., Óss, M., **Takács, K.**, Borsodi, A., Márialigeti, K., Pesti, M. (2005): The role of alkaliphilic bacterim species in the compost production enriched with wood ashes. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2005. évi Nagygyűlése és a 1st Central European Forum for Microbiology (CEFORM), Keszthely, Hungary