



***A *Schizosaccharomyces pombe sep9⁺* génjének funkcionális
analízise***

Doktori (Ph.D.) értekezés

Batta Gyula

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2010.

Jelen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács, Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (Ph.D.) fokozatának elényerése céljából.

Debrecen, 2010. február 8.

Batta Gyula
doktorjelölt

Tanúsítom, hogy Batta Gyula doktorjelölt 2004-2007 között a fent megnevezett Doktori Iskola, A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai, programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2010. február 8.

Dr. Sipiczki Mátyás
Témavezető

A *Schizosaccharomyces pombe sep9⁺* génjének funkcionális analízise

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

Írta: Batta Gyula
okleveles biológus, angol-magyar szakfordító

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

Témavezető: Dr. Sipiczki Máttyás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Borbély György	
tagok:	Dr. Fehér Zsigmond	
	Dr. Sveiczzer Ákos	

A doktori szigorlat időpontja: 2009. augusztus 24.

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr.
tagok:	Dr.
	Dr.
	Dr.
	Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2010.

1. Tartalomjegyzék

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	7
2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	9
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
3.1. A <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i> ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	13
3.2. A <i>SCH. POMBE</i> ÉLETCIKLUSA	15
3.3. A <i>SCH. POMBE</i> SEJTCIKLUSA ÉS ANNAK SZABÁLYOZÁSA	19
3.4. A <i>SCH. POMBE</i> CITOKINEZISÉNEK FOLYAMATA	20
3.5. SEJTOSZTÓDÁSBAN SÉRÜLT MUTÁNSOK ÉS A CITOKINEZIS SZABÁLYOZÁSA A <i>SCH. POMBE</i> HASADÓÉLESZTŐBEN.....	23
3.6. AZ IVARI DIFFERENCIÁLÓDÁS ÉS SZABÁLYOZÁSA A <i>SCH. POMBE</i> -BEN	25
3.6.1. Párosodási típusok	25
3.6.2. Konjugáció, meiózis, spóráképzés és e folyamatok szabályozása	26
3.7. AZ EUKARIÓTA TRANZKRIPCIÓ ÉS SZABÁLYZÁSÁNAK FŐBB ELEMEI	32
3.7.1. A transzkripció folyamata	32
3.7.2. A Mediátor komplex	35
3.7.3. A SAGA komplex	37
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	40
4.1. A DOKTORI MUNKA SORÁN FELHASZNÁLT TÖRZSEK	40
4.2. A DOKTORI MUNKA SORÁN FELHASZNÁLT PLAZMIDOK	41
4.3. A DOKTORI MUNKA SORÁN HASZNÁLT PCR PRIMEREK	43
4.4. FELHASZNÁLT TÁPKÖZEGEK, VEGYSZEREK	45
4.4.1. Tápoldatok.....	45
4.4.2. Oldatok.....	47
4.5. ALKALMAZOTT KÍSÉRLETI MÓDSZEREK	49
4.5.1. <i>Sch. pombe</i> klasszikus genetikai és mikrobiológiai módszerek	49
4.5.2. Molekuláris biológiai módszerek	51
4.5.2.1. Genomiális DNS (gDNS) izolálása	51
4.5.2.2. Plazmid DNS izolálása.....	52
4.5.2.3. RNS izolálása	52
4.5.2.4. PCR (polimeráz láncreakció)	53
4.5.2.5. Reverz transzkripció (cDNS szintézis).....	54
4.5.2.6. Kvantitatív real-time PCR.....	54
4.5.2.7. Transzformálások.....	55
4.5.3. MPA (mikofenolsav) teszt.....	57
4.5.4. Mikroszkópia	58
4.6. BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREK	58
5. EREDMÉNYEK	60
5.1. AZ INTRON HELYZETÉNEK MEGHATÁROZÁSA A <i>SEP9</i> ⁺ GÉNEN	60
5.2. A <i>SEP9-307</i> TÖRZSEKBEN TALÁLHATÓ MUTÁCIÓ HELYZETÉNEK MEGHATÁROZÁSA	61
5.3. A <i>SEP9</i> ⁺ DELÉCIÓJA.....	62
5.4. A <i>SEP9</i> ⁺ MUTÁCIÓJÁNAK HATÁSA A SEJTOSZTÓDÁSBAN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK TRANZKRIPCIÓJÁRA	66

5.5. A <i>SEP9</i> ⁺ HATÁSA AZ IVARI DIFFERENCIÁLÓDÁSBAN SZEREPE T JÁTSZÓ <i>AFF1/STE11</i> ⁺ GÉN EXPRESSZIÓJÁRA.....	70
5.6. A <i>SEP9-307</i> MUTÁCIÓ GENETIKAI KÖLCSÖNHATÁSA MEDIÁTOR ALEGYSÉGEKET KÓDOLÓ <i>SEP</i> GÉNEK MUTÁCIÓIVAL.....	72
5.7. FELTÉTELEZETT <i>SEP9</i> ⁺ ORTOLÓGOK AZONOSÍTÁSA.....	75
5.8. A <i>SCH. JAPONICUS</i> FELTÉTELEZETT <i>SEP9</i> ⁺ ORTOLÓGJÁNAK EXPRESSZIÓJA....	77
5.9. A <i>SEP9</i> ⁻ MUTÁNSOK MPA (MIKOFENOLSAV) ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA	81
6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	90
8. SUMMARY	95
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	99
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	100
11. A DOKTORI MUNKA SORÁN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK	114
11.1. KÜLFÖLDI FOLYÓIRATBAN MEGJELENT ÉS LEKTORÁLT KÖZLEMÉNYEK....	114
11.2. KONFERENCIA ELŐADÁSOK.....	114
11.3. KONFERENCIA POSZTEREK.....	115

2. Bevezetés és célkitűzés

Az élő szervezetek építőelemei a sejtek, amelyekben biológiai és kémiai folyamatok sokasága játszódik le, hogy a szervezet fennmaradhasson. E folyamatok sérülése esetén a szervezet életképtelenné válhat. A sejt szerződés az összetett létformák alappillére, ezért az alapvető sejt szintű folyamatok megismerése elengedhetetlen.

Alapvető sejt szintű folyamatok például a sejt osztódás vagy a sejt tápanyagfelvétele. Ezek rendezett működésének háttérében szabályozási folyamatok állnak, melyek lehetővé teszik, hogy a sejt reagáljon a környezetükben bekövetkező változásokra és megfeleljen az újonnan támasztott feltételeknek, kihívásoknak.

A sejt osztódás folyamata során a sejt önmagukkal azonos utódsejteket hoznak létre, melyeket leánysejteknek nevezünk. Ezek genetikailag megegyeznek a szülősejttel, ami biztosítja az élet folytonosságát. A sejt osztódás mind az eukarióta, mind a prokarióta sejtekre jellemző, de folyamataikban eltérnek, miközben a cél ugyanaz: a faj-, illetve létfenntartás.

Eukariótákra és prokariótákra egyaránt jellemző a sejt ciklus folyamata, mely a sejt osztódás szabályozását teszi lehetővé. A sejt ciklus során a sejt genetikai állománya megkettőződik és felkészül a sejt osztódásra. Ez a folyamat valamennyi eukariótában négy szakaszból áll: G1, S, G2 és M fázisok, azonban ezen életszakaszok hossza faj-, illetve többsejtű szerződés esetén szövetfüggő. Ennek a folyamatnak a biztosításában több száz gén terméke vesz részt, melyek egy része mindig csak adott időintervallumban működik, amikor a sejt a sejt ciklus adott fázisába ér, ami szabályozza a megfelelő időrendiséget. E gének mutációi

súlyos rendellenességekhez vezethetnek, daganatos betegségeket okozhatnak például az emberben is. A folyamatok alapos megismerése fontos szerepet kaphat új gyógymódok felfedezésében és bevezetésében.

A sejtciklus kutatása évtizedek óta folyik: számos fontos összefüggést felismertek már, de teljességében mindmáig sem ismert. Minél többet tudunk meg róla, annál inkább kiderül bonyolultsága és lassan már áttekinthetetlen azon géneknek a hálózata, amelyeknek termékei részt vesznek az irányításában. Az ilyen kutatások jelentős részét modellszervezeteken végzik, mivel az alapvető genetikai és biokémiai folyamatok rendkívül hasonlatosak valamennyi eukariótában, a fejlettségi szinttől függetlenül. A sejtciklus kutatásnak két legfontosabb modellorganizmusa a *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzóélesztő és a *Schizosaccharomyces pombe* hasadóélesztő, melyek egyaránt egysejtű gombák.

A sejtciklus kutatások nagy úttörője, Sir Paul Nurse, sejtciklusban sérült *Sch. pombe* mutánsokat vizsgált és felfedezett számos, a sejtciklus szabályzásában szerepet játszó alapvető gént. Munkásságáért megosztva kapott Nobel-díjat 2001-ben. Felfedezései a G2 és M fázisok közötti átmenetet tárták fel, de azóta számos adat született a többi szabályozási pont kapcsán is. Így például a G1/S átmenet és a DNS replikáció szabályozását, illetve magát a citokinezis génjeit is számos kutatócsoport vizsgálja. Az utóbbi folyamat szabályozásáról sokáig viszonylag kevés információ állt rendelkezésre. Az utóbbi években azonban a különböző citokinezisben sérült mutánsok részletes vizsgálata nyomán e folyamat szabályozásáról is számos új eredményt közzétettek.

A Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékének munkatársai több mint másfél évtizede vizsgálnak olyan

citokinezisben sérült mutáns *Sch. pombe* hasadóélesztő sejteket, melyeknek a sejtjei, az osztódást követő szétválásban sérültek (szeperációs mutánsok). A mutáns fenotípus háttérében a „sep”-eknek elnevezett gének mutációi állnak. E gének közül már korábban azonosításra került a *sep1*⁺, *sep10*⁺, *sep11*⁺ és *sep15*⁺. Eme gének mutációi azonban nem csak a citokinezis eseményében okoznak kárt. Így például a hibás vagy hiányzó Sep10, Sep11 és Sep15 fehérjék ivari differenciálódási problémákat is eredményeznek, amely során gátolt a sejtek konjugációja és a spóraképzés is elmarad, illetve sok esetben tapasztaltak gyengébb stresszválasz képességet is. Ezek a megfigyelések felvetették annak a lehetőségét, hogy e gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek több, a funkciók szempontjából eltérő szerepű génekre vannak hatással, azaz hogy a „sep” gének termékei esetleg transzkripciós faktorokat kódolnak. A felvetések, tanszékünk korábbi eredményei alapján igazolódtak. A *sep1*⁺-ről bebizonyosodott, hogy egy fork-head típusú DNS kötő fehérjét kódol, mely a sejtciklus szabályozásában tölt be rendkívül fontos szerepet. A *sep10*⁺, *sep11*⁺ és *sep15*⁺ pedig olyan fehérjéket kódolnak, melyek a transzkripció szabályozásában szerepet játszó Mediátor komplex alegységei. A mutánsok hasonló fenotípusa azt sugallja, hogy ezek a fehérjék bizonyos szabályozási útvonalakban együttműködnek, például a citokinezis szabályozásában, illetve hálózatot alkotnak, hogy így fejtsék ki hatásukat.

Ennek tükrében egy korábban izolált, de még nem jellemzett szeperációs mutáns és a *sep9*⁺ gén - amelynek a mutációja okozza a rendellenességeket - vizsgálatát tűztük ki célul. Megpróbáltuk bizonyítani a mutáns jellegek vizsgálata mellett, hogy ez a gén is egy transzkripciós faktort kódol, és mint ilyen, részt vesz más gének szabályozásában,

továbbá genetikai kölcsönhatásban van más „*sep*” génekkel. Vizsgálatunk eredményeként sikerült alátámasztani azt a feltételezést, hogy a *sep9*⁺ gén valóban egy transzkripciósfaktort kódol.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A *Schizosaccharomyces pombe* általános jellemzése

A *Schizosaccharomyces pombe* a hasadóélesztők csoportjába tartozik, egy egysejtű eukarióta mikroorganizmus, amely hasadással osztódik. Ezt az élesztőgombát először Lindner (Lindner, 1893) izolálta a Kelet-Afrikában gyakran fogyasztott sörből, szuahéli nyelven pombéból, mely a faj nevét is adta. A XX. század folyamán fontos szereplőjévé vált a kutatásoknak, melynek kezdeti úttörői Osterwalder (Osterwalder, 1924), Stelling-Dekker, illetve Urs Leupold voltak. Az 1950-es évektől egyre többet alkalmazták különböző kísérletekben, de az igazi áttörést a 70-es évek jelentette, amikor a sejtciklus vizsgálatában kezdték el felhasználni. Manapság szinte minden alapvető sejtfolyamatot vizsgálnak rajta (Egel, 2004 és <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/history1.html>).

A *Sch. pombe* általános jellemzése, és mint általánosan használt modellszervezet bemutatása Zhao és Lieberman (1995), illetve Egel (2004) összefoglaló munkája alapján történik. A *Sch. pombe* modellszervezetet világszerte alkalmazzák, ami számos kedvező tulajdonságának köszönhető. Ilyenek a rövid generációs idő (2–4 óra), az egyszerű kezelhetőség és a könnyű tenyésztés laboratóriumi körülmények között, a *Sch. pombe*-hez kifejlesztett számos molekuláris biológiai módszer, továbbá a többsejtű, magasabb rendű élőlényekkel való molekuláris, biokémiai, és genetikai hasonlóságok (például a génjei sok esetben tartalmazznak intronokat, illetve számos emlős promóter használható a génszabályozásban). Lévéen eukarióta, képes termelni más eukarióták fehérjéit, és génjei más eukariótákhoz hasonlóan szabályozhatóak. Tekintve, hogy alapvetően haploid, a genetikai elváltozások azonnal megjelennek, azonban könnyen diploidizálható is,

így akár komplementálási kísérletek, vagy a domináns-recesszív tulajdonságok vizsgálata is elvégezhető vele. További előny, hogy a *Sch. pombe* genommérete viszonylag kicsi ($\approx 14,1$ Mb), és mindössze három kromoszómája van. Plazmidok széles köre alkalmazható az *Sch. pombe*-nél. Mindezeket túl 2002-re a genom szekvenciájának közel 100%-a is ismertté vált (Wood és mtsi, 2002).

A *Sch. pombe*, a *Sch. japonicus*-szal, a *Sch. octosporus*-szal, illetve a nemrégiben leírt *Sch. kambucha*-val (Singh és Klar, 2002 és 2003) alkotják a hasadóélesztők csoportját, melynek pontos rendszertani besorolását az **1. ábrán** láthatjuk.

Királyság *Mycota*

Törzs *Ascomycota*

Altörzs *Archiascomycotina* (*Taphrinomycotina*)

Osztály *Schizosaccharomycetes*

Rend *Schizosaccharomycetales*

Család *Schizosaccharomycetaceae*

Nemzetség *Schizosaccharomyces*

Faj *Sch. pombe*

Sch. pombe var. *pombe*

Sch. pombe var. *malidevorans*

Sch. japonicus (*Hasegawaea japonica*)

Sch. japonicus var. *japonicus*

Sch. japonicus var. *longobardus*

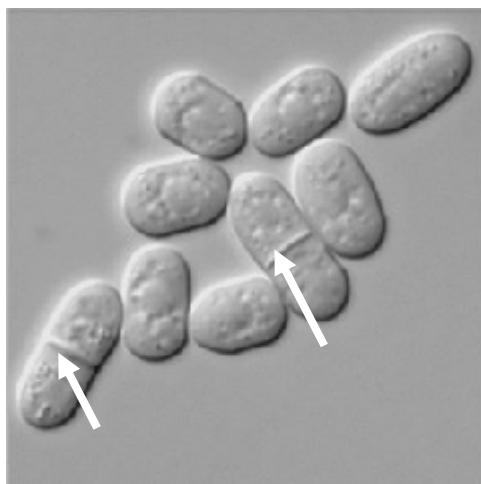
Sch. japonicus var. *versatilis*

Sch. octosporus (*Octosporomyces octosporus*)

Sch. kambucha

1. ábra. A *Schizosaccharomyces* fajok rendszertana. A rendszertani besorolás DNS szekvenciák alapján történt, olyan szakaszok összehasonlító elemzésével, mint például a 16S vagy 26S rRNS-t kódoló régiók, valamint az ITS4 szekvencia szakasz. (Sipiczki M, 2000 nyomán).

A hasadóélesztők a nevüket jellegzetes osztódásukról kapták, ennek során a sejtek a növekedést követően középvonaluknál válnak szét utódsejttekké. A vad típusú *Sch. pombe* sejtek normál körülmények között egysejtűek, a sejtek alakja hosszúkás, pálcika alakú, kb. 3µm széles és 8–14µm hosszú (**2. ábra**). Bizonyos speciális körülmények (hosszú tenyésztési idő (14 nap), igen magas glükóz (20 g/L) és rendkívül alacsony nitrogén tartalmú (mindössze 1%-a a szokásosnak) táptalaj) között képezhetnek valódi hifát is (Amoah-Buahin és mtsi, 2005).



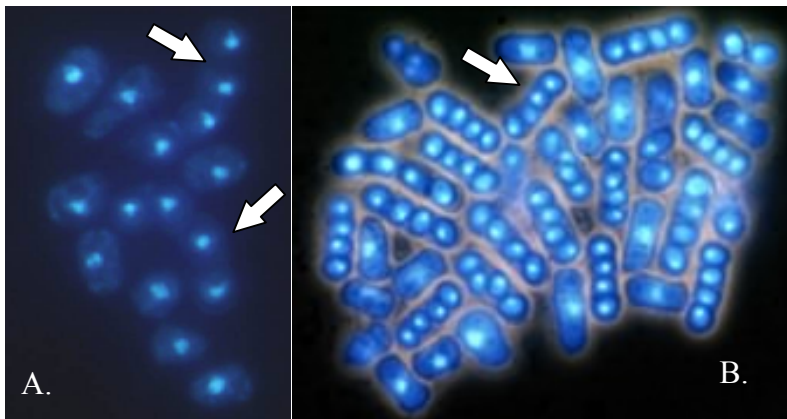
2. ábra. Vad típusú *Sch. pombe* sejtek. Jól látható a sejtek középvonal mentén történő osztódása. A válaszfal képzésének helye nyíllal van jelölve. Forrás: www.irp.oist.jp/g0/research.php.

3.2. A *Sch. pombe* életciklusa

A *Sch. pombe* életciklusának az alábbiakban történő összefoglalása Gutz és mtsi (1974), MacNeill és Nurse (1997), Nielsen (2004),

Yamamoto (2004) valamint Harigaya és Yamamoto (2007) áttekintő munkái alapján történik.

Elegendő tápanyag jelenlétében a haploid *Sch. pombe* sejtek a mitotikus sejtciklusban növekednek és vegetatívan, hasadással szaporodnak. A tápanyag (nitrogén és/vagy glükóz) megvonása által kiváltott stresszválasz hatására azonban kilépnek a mitotikus sejtciklusból, és amennyiben a környezetükben nem találhatók ellentétes párosodási típusú sejtek, úgy belépnek a nyugalmi G_0 fázisba. A nyugalmi állapotban a sejtek ellenállóbbak a környezeti hatásokkal szemben (pl.: magas és alacsony hőmérsékleti viszonyok). A G_0 fázisba lépéshez számos gén aktivitására van szükség. Azonban, ha jelen vannak ellentétes párosodási típusú sejtek, akkor a nitrogénéhezés azon túl, hogy megállítja a sejtciklust a G_1 fázisban, indukálja az *aff1/stell*⁺ gén expresszióját, ami elengedhetetlen a sejtek konjugálásához, ezáltal végső soron diploid sejtek jönnek létre (zigóták). Ha továbbra is fennáll a tápanyaghiány, a diploid sejtek meiotikus osztódáson mennek keresztül, melynek végén négy kerek askospóra keletkezik, amelyek jellegzetes mikroszkópi képet mutatva sorban egymás után, a zigotikus askusban helyezkednek el (**3.A. ábra**).

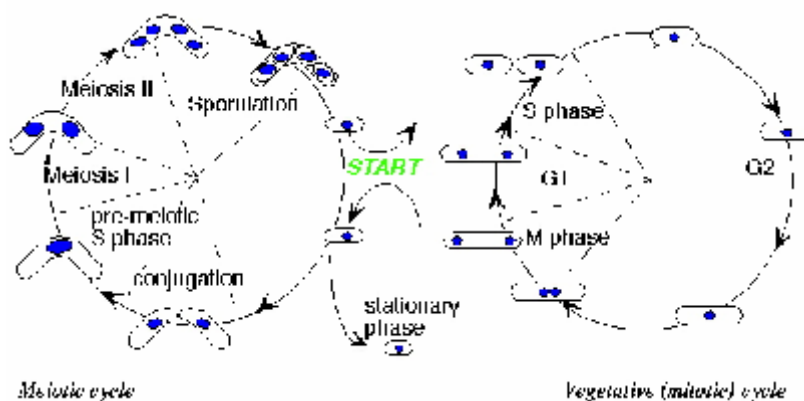


3. ábra. A *Sch. pombe* aszkuszképzése. **(A.)** A *Sch. pombe* zigotikus aszkuszai (forrás: Szilágyi és mtsi, 2005). Jól látható, hogy négy spóra található egy-egy aszkuszban.
(B.) Azigotikus aszkuszkok, melyekben a spórák egyenes vonal mentén helyezkednek el (forrás: www-rcf.usc.edu/~forsburg/main.html).

Az aszkuszból való kiszabadulás után a spórák - ha megfelelő körülmények közé kerülnek - csírázásnak indulnak. Az alvó spórák „felébresztéséhez” glükózza van szükség, ami cAMP - cAMP függő protein kináz útvonal aktiválásával generálja a germináció iniciálásához szükséges jelet. Ahhoz azonban, hogy a spórákból ténylegesen kinőjenek a sejtek, nem elég a glükóz jelenléte, szükséges más tápanyag is, elsősorban nitrogénforrás. Ideális körülmények közt a spórából kinő a haploid sejt, amely a mitotikus sejtciklusba lép vissza, és ezzel a kör bezárul, visszatérünk a kiindulási állapothoz.

Létezik azonban egy kitérő útvonal is. A diploid sejtek nem csak zigotikus aszkuszt hozhatnak létre. Ha a diploid sejteknek az éhezés okozta stresszt megszüntetendően elegendő tápanyagot biztosítunk, akkor azok a sejtek, amelyek még nem kezdték meg a meiotikus osztódást, belépnek a mitotikus sejtciklusba, és diploid sejt kultúrát hoznak létre. A

diploid állapot nem tartható fenn hosszabb ideig, a sejtek a haploid állapotot preferálják, és paraszexualitás révén igyekeznek azt elérni egy haploidizációs folyamattal, ami a *Sch. pombe* esetében gyorsan történik köszönhetően annak, hogy csak három kromoszómája van. A paraszexualitás útjára lépett sejtek esetében sosem történik meiózis, tekintve, hogy már nem rendelkeznek diploid kromoszómakészlettel.. Ha a diploid sejtektől is megvonjuk a tápanyagokat (szintén szén- és nitrogénéhezés), akkor ezzel meiotikus osztódást indukálunk bennük, aminek az eredménye a zigotikus aszkuszhoz hasonló négy kerek haploid spórát tartalmazó azigotikus aszkusz létrejötte (**3.B. ábra**). A spórák kiszabadulásával és ideális feltételek közti kicsírázásával pedig ismét visszajutunk a kiindulási ponthoz, a mitotikus sejtciklusban lévő haploid sejthez. A *Sch. pombe* jellegzetes szaporodási ciklusait a **4. ábra** szemlélteti.



4. ábra: A *Sch. pombe* lehetséges szaporodási ciklusai (forrás: www-rcf.usc.edu/~forsburg/main.html).

3.3. A *Sch. pombe* sejtciklusa és annak szabályozása

A *Sch. pombe* sejtciklusának ebben a fejezetben található rövid bemutatása MacNeill és Nurse (1997), illetve Gould (2004) összefoglaló munkássága alapján készült.

A magasabb rendű eukariótákéhoz hasonlóan a *Sch. pombe* sejtciklusa négy különálló szakaszra bontható: a G₁, S, G₂ és M fázisra. A G₂ fázis viszonylag hosszú, a teljes ciklus mintegy 70%-át teszi ki, míg a másik három egyenként 10–10%-ot. Mivel a másik három szakasz ilyen gyorsan lejátsszódik (kivéve, amikor a spórából fejlődik ki az új sejt, mert akkor a G₁ fázis elnyúlik), az osztódó sejtek a teljes szeparálódás idején már G₂ fázisban vannak.

A sejtciklus szabályozásában két kritikus kontroll pont van: az egyik a G₁ fázis végén, a másik a G₂ fázis végén. A G₁ fázis ellenőrző pontját addig nem lépheti át a sejt, amíg egy bizonyos méretet el nem ért, és az előző mitózis be nem fejeződött. Ezen ellenőrzőpont (vagy „Start” pont) átlépése után a sejt elkötelezetté válik a mitotikus osztódás irányába - előtte azonban még beléphetne a szexuális ciklusba. A másik nagyobb ellenőrző pont a mitózisba lépést időzíti, aminek átlépéséhez szintén egy megfelelő sejtméret elérésére van szükség, valamint arra, hogy az S fázis befejeződjön, vagyis a DNS szintézis és javítási mechanizmus folyamatai véget érjenek. Ezeken kívül azonban még számos kisebb ellenőrző pont is létezik (lásd bővebben Carr és Caspari, 2004, összefoglaló munkájában).

A sejtciklus folytonosságáért, mint más szervezeteknél is, elsősorban ciklinek és ciklin dependens protein kinázok felelnek (lásd Gould 2004-es összefoglaló munkáját). A legfontosabb szerepe a *cdk1/cdc2*⁺ gén termékének, a Cdk1/Cdc2-nek van, amely egy szerin-treonin kináz, és esszenciális mind a DNS megkettőződésében, mind a mitózisban.

Továbbá e fehérje nélkül a sejt nem juthat túl a „Start” ponton és a G₂/M átmenetnél lévő ellenőrző ponton. A *Sch. pombe* sejtciklusának szigorú szabályozása is a magasabb rendű élőlényekhez hasonlóan leginkább a foszforiláció-defoszforiláció útján történik, melyben különböző gátló és serkentő hatású kinázok vesznek részt. A legfontosabb ilyen gátló fehérjék a Wee1 és a Mik1, melyek foszforiláció révén szabályoznak. Továbbá különböző ciklinek is elengedhetetlenek a szabályozásban, így Cig1 és Cig2, melyek B típusú ciklinek és komplexet alkotnak a Cdk1/Cdc2-vel (lásd még Fisher és Nurse 1995-ben megjelent összefoglaló munkáját is).

3.4. A *Sch. pombe* citokinezisének folyamata

A citokinesis a mitotikus sejtciklus befejező szakasza, mely Su és Yanagida (1997), McCollum és Gould (2001), Balasubramanian és McCollum (2004), illetve Wolfe és Gould (2005) összefoglaló publikációi nyomán kerül bemutatásra e dolgozatban.

A citokinesis során az anya- és leánysejt véglegesen két független sejtté válik, azonban ez a folyamat a sejtmag kettéosztódásától függetlenül is végbemehet. A mitózis befejezésekor az eddig a sejt végein csoportosuló F-aktin a sejt középső síkjába rendeződik, és kialakítja a több, mint 20 féle fehérjéből felépülő aktomiozin kontraktilis gyűrűt (más néven középgyűrű vagy mediális gyűrű) a sejt kortexénél (lásd bővebben Simanis 2003-ban közzétett összefoglaló munkájában). Ez hasonlít a magasabb rendű állati sejteknél tapasztalható folyamatokra, ezért a *Sch. pombe* kitűnő modellszervezet a sejtosztódást vizsgáló kutatásokban is.

A mediális gyűrű kijelöli a későbbi válaszfal képződésének helyét. A középgyűrű képződésének helyét a Mid1 és Plo1 fehérjék közvetítésével -

melyek be is épülnek a gyűrűbe - az interfázisos sejtmag határozza meg, amely a sejt közepén található; ez a folyamat még a G2 fázis végén lejátsszódik. A mediális síkban a mikrotubulus organizációs centrum (MTOC) mikrotubulusokat képez, ami segíti a kontraktilis gyűrű egy síkban maradását.

Az osztódó sejt plazmamembránja az összehúzódó aktomiozin gyűrű nyomán betüremkedik, létrejön a β -glükán alapú elsődleges szeptum, melyen összegyűlnek a később ennek mentén szintetizálódó másodlagos szeptum építőkövei. A másodlagos válaszfal az elsődleges szeptum mindkét oldalán képződik (Johnson és mtsi, 1973), majd a szintézis befejeztével a primer fal feloldódik, így a sejtek elválnak egymástól (bővebben lásd e dolgozat 3.5. fejezet). A sejteket elválasztó fal tehát elsődleges és másodlagos szeptumból épül fel, a másodlagos szeptum az elsődleges megléte nélkül nem képes megszintetizálódni (Johnson és mtsi, 1973). Az elsődleges és másodlagos válaszfal - melyek felépítését Bush és mtsi (1974), Humbel és mtsi (2001) és Sugawara és mtsi (2003) írták le - szerkezetét tekintve közös, hogy mindkettő tartalmaz $1,3\text{-}\alpha$ -glükánt, $1,6$ elágazó $1,3\text{-}\beta$ -glükánt és galaktomannánokat, de csak a primer szeptumban van el nem ágazó $1,3\text{-}\beta$ -glükán, és csak a szekunder szeptum rendelkezik $1,6\text{-}\beta$ -glükánnal. A válaszfalak egyes komponenseit helyben szintetizálják enzimek, mint például a Mok1, mely egy létfontosságú fehérje (Katayama és mtsi, 1999).

Ezután az aktin újra a sejt „régí”, eredetileg is meglévő pólusába csoportosul, mivel itt van rá szükség a további növekedéshez. A *Sch. pombe* sejtek növekedése az ún. NETO (New End Take Off) pontig monopoláris, kizárólag az eredeti végen nő a sejt; és majd csak a NETO

pont elérése után válik a növekedés az osztódást követően ismét bipolárisrá.

A *Sch. pombe*-ben a mitózis befejezésében és a szeptumképződés elindításában egy komplex rendszernek van kiemelkedő szerepe, melynek neve SIN (Septation Initiation Network). A SIN szignalizációja számos fehérjén keresztül valósul meg, melyek közül kiemelkedik a Cdk1-Ciklin B útvonal, azonban magát az aktiválást feltételezhetően a *pol1*⁺ gén terméke végzi. A SIN pontos szerepe még nem teljesen tisztázott; annyi azonban bizonyos, hogy minden olyan sejt, amelyben a SIN hibásan működik, zavart szenved a szeptumképzésben. Valószínűleg az aktomiozin gyűrű stabilitásának megőrzésében, összehúzóódásának elősegítésében és a szeptumképzésben van szerepe. Feltételezik még, hogy szerepet játszik az interfázisos sejtben is, illetve az anafázis hosszának szabályozásában a mitózis során (ld. még Simanis, 2003 összefoglalója). A SIN szerepéről bővebben Krapp és Simanis (2008) áttekintő publikációjában olvashatunk.

A primer és a szekunder szeptumok kialakulását követően a sejtek szétválnak. Ez a folyamat még nem teljesen tisztázott, de a legújabb elméletek szerint úgy gondolják, hogy enzimatis folyamatok játsszák a fő szerepet. A lebontó folyamatban résztvevő enzimek egy része már az aktomiozin gyűrű kialakulása előtt odakerül, ezek azonban csak később, a másodlagos válaszfal szintézisének befejeződése után válnak aktívvá. Két nagyon fontos hidroláz enzimet fedeztek fel az elmúlt évek során, melyek részt vesznek az elsődleges szeptum feloldásában: Agn1 és Eng1. Az előbbi egy α -glükánáz és tulajdonképpen ez indítja el a szeptum feloldását azáltal, hogy a válaszfal mentén a sejtfalat megbontja (Dekker és mtsi, 2004; García és mtsi, 2005), míg az Eng1 egy β -glükánáz és a primer

szeptum bontásában vesz részt (Martín-Cuadrado és mtsi, 2003). Azonban a fizikai hatásoknak is fontos szerepe lehet a sejtek szétválásában, elsősorban a turgornyomásnak, mely a másodlagos válaszfalak mentén alakul ki (Sipiczki és Bozsik, 2000).

3.5. Sejtszeparációban sérült mutánsok és a citokinezis szabályozása a *Sch. pombe* hasadóélesztőben

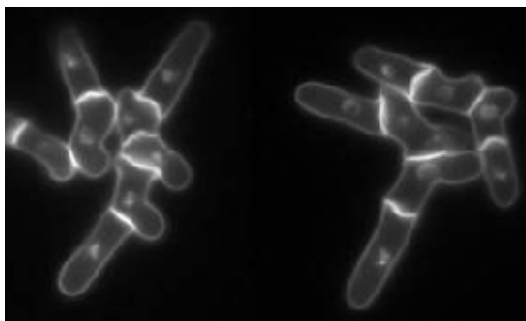
A citokinezis folyamatainak tanulmányozásában jó szolgálatot tehetnek az olyan sejtosztódásban sérült mutánsok, melyek a mitózis végén nem válnak szét. E mutáns törzsek sejtjei - a vad típusú *Sch. pombe* hasadóélesztő sejtekkel ellentétben - együtt maradnak, rövid hifákat képeznek (lásd Sipiczki, 2007, áttekintő cikkét). A szeparációban sérült mutánsokat („sep” mutánsok) először Sipiczki és munkatársai izolálták, s a felelős sérült géneket „sep” géneknek nevezték el (Sipiczki és mtsi, 1993; Grallert és mtsi, 1999). Eddig részletesen a *sep1*⁺, *sep10/med31*⁺, *sep11/med18*⁺ és *sep15/med8*⁺ géneket és mutációik hatását vizsgálták.

E gének mindegyike transzkripciós faktort kódol, melyek több folyamatban is részt vesznek. Így nem csak a sejtosztódás, hanem például az ivari differenciálódás szabályozásában is van szerepük, ugyanis a *sep1*⁺ génben sérült mutánsok kivételével, e gének mutációja sterilitást okoz. A *sep1*⁺, amely az első azonosított sejtszeparációs gén volt (Sipiczki és mtsi, 1993), egy HNF-3/forkhead doménnel rendelkező forkhead típusú transzkripciós faktort kódol (Ribár és mtsi, 1997). A *sep10/med31*⁺, *sep11/med18*⁺ és *sep15/med8*⁺ Mediátor komplex alegységeket kódoló gének (ld. bővebben a dolgozat 3.7.2. fejezetében), míg a *sep9*⁺ gén egy olyan transzkripciós faktort kódol, mely nagyfokú hasonlóságot mutat a *S. cerevisiae* SAGA komplexének Spt8

alegységével. A Mediátor és a SAGA komplex az általános transzkripció „gépezet” részei, ezért is szélesebb spektrumú a hatás, ha az alegységeket kódoló gének és ezáltal a komplexek is sérülnek (Sipiczki, 2007).

Az elmúlt években sok információt sikerült felderíteni az Eng1 és Agn1 enzimek (lásd 3.4. fejezet) szabályozási mechanizmusáról, amelyben a legfontosabb résztvevő fehérjék: a Sep1, Ace2, Fkh2 és Mbx1. Az Ace2 egy cink-ujj domént tartalmazó protein, melynek hiánya a *sep1*⁺ génben sérült mutánsokéval teljesen megegyező fenotípust eredményez (Martín-Cuadrado és mtsi, 2003). Az *ace2*⁺ gént a Sep1 transzkripció faktor aktiválja (Rustici és mtsi, 2004). Ezután az Ace2 aktiválja az *eng1*⁺ és *agn1*⁺ géneket, de számos más gén átírását is serkenti, melyek expressziójuk csúcsát a szeptáció idején érik el (Alonso-Nuñez és mtsi, 2005). Míg a Sep1 aktivál, addig az Fkh2 és Mbx1 szerepe az *ace2*⁺ transzkripciójában az, hogy feltehetően az interfázis alatt csökkentik az átírás szintjét, azaz negatív regulátorokként funkcionálnak (Buck és mtsi, 2004; Rustici és mtsi, 2004, Petit és mtsi, 2005). Az *fkh2*⁺ szerepe a G2/M átmenet szabályozásában is kulcsfontosságú (Szilágyi és mtsi, 2005). Tehát a Sep1 első hullámban az *ace2*⁺-t aktiválja, majd második hullámban az Ace2 azokat a géneket, melyek termékei részt vesznek az utódsejtek szétválásában. Az Ace2 az *eng1*⁺, és *agn2*⁺ géneken kívül, a *mid2*⁺, *adg1*⁺, *adg2*⁺, *adg3*⁺ és *cfh4*⁺ gének transzkripcióját szabályzó fehérje is (Alonso-Nuñez és mtsi, 2005; Petit és mtsi, 2005). A Mid2 a sejtek osztódásához szükséges szeptingyűrű szervezésében vesz részt, kijelöli a sejtosztódás helyét, hiánya csak enyhe sejtszeparációs problémákat okoz (Bähler és mtsi, 1998; Berlin és mtsi, 2003; Tasto és mtsi, 2003). Az Adg1, Adg2, Adg3 és Cfh4 fehérjék

funkciója eddig nem ismert. Szeparációs mutánsokat láthatunk az **5. ábrán**.



5. ábra: A képen $ace2^+$ hiányos mutánsokat láthatunk; a sejtfalakat és a szeptumot a kalkofluor teszi láthatóvá. Forrás: Alonso-Núñez és mtsi, 2005.

3.6. Az ivari differenciálódás és szabályozása a *Sch. pombe*-ben

A *Sch. pombe* életciklusa során alapvetően haploid és vegetatív osztódással szaporodik (lásd 3.2-5.). Azonban, ha a nitrogénforrás elapad, akkor a sejtek belépnek a szexuális ciklusba, melynek során a megfelelő párosodási típusú sejtek konjugálnak, meiózison esnek keresztül és aszkospórákat képeznek.

3.6.1. Párosodási típusok

A *Sch. pombe* párosodási típusainak alábbi jellemzése Klar (1990) Yamamoto (1996), Arcangioli és Thon (2004), illetve Nielsen (2004) összefoglaló munkái alapján kerül bemutatásra.

A *Sch. pombe* sejtek lehetnek homotallikusak és heterotallikusak is. A vad típusú sejtek többnyire homotallikusak, hogy ha a körülmények kedvezőtlenre fordulnak, a túlélés érdekében azonnal tudjanak konjugálni

és spórákat képezni. A heterotallikus törzsek viszont a saját klónnal való párosodás kizárása révén növelik a populáció genetikai varianciáját, és így növelik a populáció túlélési esélyeit.

A *Sch. pombe* esetében kétfajta párosodási típus ismeretes: az M (minus) és a P (plus), melyek alapján a heterotallikus törzseket rendszerint h^- -al, illetve h^+ -al jelöljük. A homotallikus törzsek jele h^{90} , mivel a sejtek körülbelül 90%-a párosodik nitrogénéhezés hatására.

A párosodási típust a második kromoszómán lévő *mat1*⁺ lókuszt határozza meg, amelybe rekombináció és az azt követő DNS javítási mechanizmus során a csendes *mat2P*⁺ vagy *mat3M*⁺ donor lókuszt egyikének genetikai információja másolódik át; a *mat2P*⁺ a P típus genetikai információját hordozza, míg a *mat3M*⁺ az M párosodási típusét. Ezen alapul a párosodási típusváltás. A homotallikus populációban a P és M típusú sejtek aránya nagyjából megegyezik. A DNS replikációja során a rekombinációs eseményt a *mat1*⁺ lókuszt határoló homológ szekvenciákat hordozó boxok, illetve a *mat2P*⁺ és *mat3M*⁺ lókuszt határoló homológ boxok teszik lehetővé. A *mat1M*⁺ lókuszt két transzkripció egységet tartalmaz, ezek a *mat1-Mc*⁺ és a *mat1-Mm*⁺; hasonlóan a *mat1P*⁺ lókuszt *mat1-Pc*⁺-t és *mat1-Pm*⁺-t tartalmaz. A *mat1-Mc*⁺ és a *mat1-Pc*⁺ nélkülözhetetlenek a konjugációhoz és a meiózishoz egyaránt, a *mat1-Mm*⁺ és a *mat1-Pm*⁺ pedig a meiózishoz szükségesek. A homotallikus törzsekben mindkét bokszt megtalálható, míg a heterotallikusokban általában valamelyik bokszt sérült vagy a rekombinációs folyamatok sérültek, ami a párosodási típusváltáshoz elengedhetetlen folyamat.

3.6.2. Konjugáció, meiózis, spóráképzés és e folyamatok szabályozása

A *Sch. pombe*-ben lejátszódó konjugációs, meiotikus és spórázási folyamatok rövid ismertetése Yamamoto és mtsi (1997), Nielsen (2004), Shimoda és Nakamura (2004), Yamamoto (2004), valamint Harigaya és Yamamoto (2007) áttekintő munkái alapján kerül bemutatásra.

Az egész genomra kiterjedő transzkripciós vizsgálatok azt mutatták, hogy a szexuális ciklus négy részre, négy egymást követő hullámra osztható, melyben gének százai aktiválódnak, és mindegyik hullámban az aktivált gének specifikus promótermotívumokkal rendelkeznek. A négy hullám és a kulcsszerepet játszó szabályozó gének a következők: az első az éhezés és feromon indukált válasz, melyben a legfontosabb szerepet az *aff1/stell1*⁺ játssza. A második a premeiotikus S fázis és a rekombináció, ekkor a *cdc10*⁺, *res2*⁺ és *rep1*⁺ gének termékei a legfontosabb aktivátorok. A harmadik hullámban történnek a meiotikus osztódások, ekkor a *mei4*⁺-ről átírt protein a meghatározó. Az utolsó hullám a spóráképzés, melyben ATF (Activating Transcription Factor) típusú transzkripciós faktorok végzik a fő szabályozást.

A tápanyagmegvonás a *Sch. pombe* sejtekben elindítja a szexuális ciklust, amennyiben van a közelükben olyan fajtárs, akivel képesek párosodni. A tápanyagmegvonás elsősorban a nitrogén megvonását jelenti, a glükóz megvonása sokkal kevésbé hatékony, s ilyenkor a sejtek inkább megrekednek G₂ fázisban, viszont felerősíti a nitrogénmegvonás hatását. Nitrogén hiányában a sejtek intracelluláris cAMP szintje lecsökken azáltal, hogy az adenilát-cikláz kódoló *cyr1*⁺ gén expressziója mintegy felére esik. A magas cAMP szint gátolja a párosodást és a meiózist, míg az alacsony intracelluláris cAMP szexuális ciklust indukál. A cAMP termelődését a glükóz serkenti, és a cAMP egyik hatása, hogy a

repressziót feloldva aktiválja a Pka1 cAMP-dependens kinázt, ami gátolja a szexuális ciklus beindulását.

A nitrogénéhezés és az ezáltal kiváltott cAMP szint csökkenés számos gént aktiválva végül az *aff1/ste11*⁺ gén expressziójához vezet, amely egy HMG (High Mobility Group) transzkripciós faktor, és kulcsfontosságú szerepet tölt be a párosodáshoz és meiózishoz szükséges gének expressziójában. Az *aff1/ste11*⁺ gén kifejeződését, a promóterhez kötődve indukálja a Pka1 target Rst2 fehérje. Ez a fehérje negatív szabályzás alatt áll, ugyanis foszforilált formában nem tudja aktiválni az *aff1/ste11*⁺ transzkripcióját. Tehát, amikor a környezet nitrogén szintje lecsökken, egy ismeretlen jelátvitelt követően a cAMP szint leesik és a cAMP függő Pka1 inaktívvá válik, mely az Rst2 defoszforilálásához vezet és aktiválhatja az *aff1/ste11*⁺ átírását.

A nitrogén és glükóz megvonásának másik hatása, hogy beindít egy olyan általános stresszválaszt, melynek központi szabályzó eleme a Sty1-Atf1-Pcr1 rendszer (a stresszválaszról bővebben: Millar, 1999-ben megjelent összefoglaló cikke), s ez szintén hozzájárul az *aff1/ste11*⁺ transzkripciós aktiválásához az *aff1/ste11*⁺ promóterében megtalálható úgynevezett CRE elemeken (cAMP Responsive Elements) keresztül. E nélkül az *aff1/ste11*⁺ nem képes kifejeződni és a párosodás elmarad, illetve más gének expresszióját is befolyásolják, melyek a sejtek G₁-ben maradásához szükségesek. A cAMP és a Sty1 útvonalak kölcsönhatása azonban még pontosan nem ismert.

Az *aff1/ste11*⁺ nagyon fontos gén, a szexuális ciklus központi génje, terméke számos más gén expresszióját szabályozza, melyek többségének aktivációja párosodáshoz vezet, de nem mindegyik hozható összefüggésbe a szigorúan vett szexuális ciklussal. DNS „microarray”

segítségével eddig 62 ilyen gént találtak meg az *Aff1/Ste11* targetjeként, és további 16 olyan gén expressziós szintjét befolyásolta, melyek a sejttípus meghatározásához szükségesek (Mata és Bähler, 2006).

Az *aff1/ste11*⁺ aktiválja a *mat1*⁺ lókuszban lévő *mat1-Mc*⁺ (M típusú sejteknél), illetve *mat1-Pc*⁺ gének (P típusú sejteknél) átíródását. A *mat1-Mc*⁺ és *mat1-Pc*⁺ gének produktumai aktiválják a feromonválaszért közvetlenül felelős géneket. A feromonok kis méretű, a sejtek által szekretált peptidek. A P típusú sejtek P faktort, míg az M típusú sejtek M faktort termelnek. Az M faktort három gén kódolja: a *mfm1*⁺, *mfm2*⁺ és *mfm3*⁺, míg a P faktort a *map2*⁺ gén kódolja. Ezek segítségével érzékelik az ellentétes párosodási típusú *Sch. pombe* sejtek egymás közelségét. Ha nem érzékelnek olyan feromont a közelben, ami receptoraikon megkötődik, akkor a sejtek a szexuális ciklus folytatása helyett nyugalmi, G₀ fázisba lépnek (lásd még MacNeill és Nurse, 1997). Amint a feromonok megkötődnek az ellentétes párosodási típusú sejt receptorain (P sejt: Map3, M sejt: Mam2), beindítják az intracelluláris MAP kináz kaszkádot, ami ahhoz vezet, hogy a sejtciklus megáll a G₁ fázisban, megkezdődik a szükséges gének transzkripciója, és a sejtek elkezdnek növekedni a feromonforrás irányába.

A MAP kináz kaszkád az *aff1/ste11*⁺ gént aktiválja, ily módon az *Aff1/Ste11* a feromonválasz aktiválása révén visszahat önmagára, autoregulációt tart fenn. Az *Aff1/Ste11* tehát a feromon által aktivált géneket is szabályozása alatt tartja. A feromon kiváltotta jelátvitelhez szükség van a Ste6 és Ras1 fehérjékre is, utóbbi a polarizált sejtnövekedésben is szerepet játszik. A Ras1 aktiválja a Cdc42 proteint, ami a citoszkeleton aktin filamentumainak szerveződésének szabályozásáért felelős (továbbá lásd még Hughes, 1995 összefoglalója).

A morfológiai változásokat az aktin reorganizációja idézi elő. Az eredetileg monopolárisan elhelyezkedő F-aktin elemek a sejt két csúcsába lokalizálódnak, így a párosodás bármilyen irányból megkezdődhet. Amint a feromonreceptorok közvetítik a feromonszignált, az aktineloszlás ismét monopoláris lesz: arra a végre koncentrálnak, ahol a feromont érzékelték a sejt, lehetővé téve így a konjugáláshoz szükséges „csőr” kinövését a sejtéből.

Alighogy a sejtek fizikai kontaktusba lépnek egymással, az Aff1/Ste11 aktiválta M-specifikus és P-specifikus gének által kódolt és korábban a sejtfelszínre transzportálódott agglutininek segítségével összetapadnak, s így megakadályozzák a potenciális párosodási partnerek elsodródását egymástól.

Az összetapadt sejtekben három fontos folyamat veszi kezdetét: a sejtek fúziójához nélkülözhetetlen mikrotubulus organizációs centrum (MTOC) képződik a sejtek egymással érintkező csúcsánál. Ez az MTOC mikrotubulusokat képez a sejtmag irányába, amelyek a kromoszómák telomerjeihez kötődnek. Ezt követően a sejtmagok megkezdik mozgásukat a csúcsok felé és a sejt párok úgynevezett „lófarok” fázisba lépnek.

Ahhoz, hogy a sejt fúzió valóban végbemehessen, le kell bontani a sejteket elválasztó falakat. Ebben a profilin és a tropomiozin mellett kulcsszerepet játszik a Fus1, melynek expressziójához az Aff1/Ste11 szükséges. Amint végbement a sejtfalak lebontása, létrejöhét a kariogámia, feltéve, ha a megfelelő transzportfehérjék rendelkezésre állnak. A kariogámia után a sejt beléphet a meiózisba.

Az Aff1/Ste11 számos hatása közé tartozik, hogy aktiválja a *mei2*⁺ gén átírását, ami számos más faktor mellett létfontosságú a meiózis

szempontjából. Az *Aff1/Ste11* aktiválja az M és P specifikus géneket is, amelyek közé a *mat1-Mm⁺* és a *mat1-Pm⁺* is tartozik. Ezek a *mei3⁺* gén expresszióját eredményezik, mely megszünteti az *aff1/ste11⁺* és a *mei2⁺* negatív regulációját. A Mei2 egy RNS-kötő protein, mely a premeiotikus DNS szintézishez és az első meiotikus osztódáshoz szükséges. A meiózis I elindításakor a Mei2 a sejtmagban lokalizálódik és megkötí az ún. meiRNS-t (ld. még Ohno és Mattaj 1999-ben megjelent összefoglalója).

A premeiotikus DNS szintézis során a DNS kópiaszáma megduplázódik. Ezt követi a meiotikus rekombináció még a meiózis I előtt, majd jön a meiotikus osztódás, amelyben - és persze már a rekombináció során is - fontos szerep jut a Rec8 fehérjének (Ding és mtsi, 2006), mely a testvérkromatidákat összetartja a DNS szintézistől a kromoszómák elválásáig. Ily módon valósulhat meg a számfelező osztódás.

A meiózis II sikeres lejátsszódásához számos különböző gén aktivációja szükséges, ezek közül a legfontosabb a *cdc7⁺* és a *mes1⁺*. A Cdc7 egy szerin-treonin kináz, a Mes1 szerepe még nem teljesen tisztázott, de valószínűleg szükséges az MPF (M-phase Promoting Factor) szintjének megőrzéséhez, amely nélkül nem megy végbe a meiózis II. A meiózis II során a kromoszómák a mitotikus osztódáshoz hasonlóan a sejt egyenlítői síkjába rendeződnek, majd elválnak egymástól, végeredményben négy haploid sejtmagot kialakítva a sejten belül. Ezután indulhat meg a spóráképzés.

A spóráképzésben elsősorban a „*spo*” gének játszanak szerepet (pl.: *spo3⁺*, *spo4⁺*, *spo5⁺*). A spóráképzéshez először is szükség van a sejtmembrán képzésére a leendő spórák körül, mely azután irányítani fogja a spórafalképzést is. A spórafalképzéshez kell továbbá egy 1,3-β-

glükán-szintáz és egy kitin-szintáz, valamint a 23K protein (23kDa tömegű), melyet az *isp3⁺* gén kódol.

A spórák kiszabadulva megfelelő körülmények közt differenciálódásnak indulnak és új haploid sejteket hoznak létre. Ezzel körbeér a szexuális ciklus.

3.7. Az eukarióta transzkripció és szabályozásának főbb elemei

3.7.1. A transzkripció folyamata

A gének expressziójának folyamatát és szabályozását a *S. cerevisiae* modellszervezetben tanulmányozták legbehatóbban, a hasadóélesztők esetében kevesebb információ áll rendelkezésünkre.

A *Sch. pombe*-ben zajló transzkripcióhoz kapcsolható alapvető molekuláris ismeretek alábbi összefoglalása Hadcroft és mtsi (2004), Kimura és mtsi (2004), illetve Witt és mtsi (2004) áttekintő közleményei alapján történik.

A *Sch. pombe*-ben csakúgy, mint más eukariótákban, a transzkripciót három DNS dependens RNS polimeráz végzi, melyek közül munkánk szempontjából a legfontosabb az RNS polimeráz II (Pol II), mely néhány snRNS mellett az mRNS-eket szintetizálja.

A transzkripció azzal indul, hogy a transzkripciós komplex felismeri a transzkripciós iniciációs helyet a DNS-en, és hozzákötődik. Ez transzkripciós faktorok segítségével megy végbe. A *Sch. pombe*-nél a transzkripciós iniciációs helyet a gének nagy részénél az úgynevezett TATA box jelöli, de néhány génnél az úgynevezett Homold Box játsza a promóter szerepét. Ezek nem csak az iniciációban vesznek részt: a hozzájuk kötődő specifikus fehérjék szerepet játszanak más folyamatokban is, mint például az mRNS érés vagy az RNS megkötése és

exportja a magból. Az említett promóter szekvenciákon kívül a transzkriptum első nukleotidja körüli iniciátor elemeknek (Inr) szintén fontos szerepe lehet a transzkripció iniciálásában. Továbbá a gén a kódoló szakasza előtt tartalmazhat még enhancer, silencer, UAS (Upstream Activation Sequences) és URS (Upstream Repression Sequences) szekvenciákat is, melyek mind részt vesznek a transzkripció szabályozásában.

Az RNS polimeráz II az RNS szintézis folyamán, a DNS-en számos helyen megállna, s nem menne végbe a transzkripció, ha nem lennének elongációs faktorok, melyek fenntartják a transzkriptíót. Ezek a Pol II holoenzimhez kötődnek, és meggátolják a komplex leállását és leválását. A szintetizálódó RNS-t egy „capping” apparátus az 5' végén egy sapkával látja el. Ez a sapka és a transzkripció végén a 3' vég poliadenilálása fogja megvédeni majd az érett transzkriptumot az exonukleázok lebontásától.

A transzkripció befejezése a termináció, aminek során a Pol II-nek abba kell hagynia a DNS átírását, le kell válnia, közben a kész primer transzkriptumot pedig egy endonukleáznak el kell hasítania a 3' végnél, ami után megtörténhet a poliadeniláció. Maga a termináció pontos folyamata és szabályozása nem ismert, ám kitüntetett szerepe van a DSE-nek (Downstream Sequences Elements), melynek hiányában nem jön létre a normális termináció. A DSE a 3' túlnyúló végen található, erősíti a poliadenilációs szignál hatását és megállítja a Pol II-t.

A Pol II 12 úgynevezett Rpb alegységből épül fel, melyek az „*rpb*” gének termékei. A polimeráz összetett központi enzimikus egységét, mely sok tekintetben (funkcionális és morfológiai szempontból) hasonlít a prokarióta $\alpha_2\beta\beta'$ komplexre, négy fehérje építi fel: az Rpb1, az Rpb2, Rpb3 és az Rpb11. Az Rpb1 és Rpb2 alkotja a katalitikus alegységet, míg

az Rpb3 és Rpb11 a komplex két nagy alegysége közt teremt kontaktust. A Pol II szabályozása az alegységek foszforilációjával-defoszforilációjával történik. A legfontosabb szerepe ebben az Rpb1-nek van, ez ugyanis rendelkezik egy hosszú C-terminális doménnel (CTD), mely polifoszforilációs helyet biztosít a CTD kinázok és defoszforilációs CTD foszfatázok számára. *Sch. pombe*-ben 3 CTD kinázt (CtdK1, THIIH és az Srb10-Srb11 komplex) és egy CTD foszfatázt (Fcp1) ismernek.

A transzkripcióban és szabályzásában számos faktor vesz részt, általános és specifikus transzkripciós faktorok is. Előbbiek neve: GTF (General Transcription Factor). A legjobban ismert általános transzkripciós faktor a *Sch. pombe*-ben a TFIID, mely egyrészt felismeri és megköti a promótert, másrészt a transzkripció elemei számára egy összeszerelő felületet biztosít. Hasonlóan más eukarióták TFIID-jéhez, a *Sch. pombe* hasadóélesztőé is több alegységből épül fel, melyből egy a TATA kötő fehérje (TATA Binding Protein, TBP), a többi a hozzá kapcsolódó faktor (TBP-Associated Factors, TAFs). A TFIID-t is felépítő hisztonszerű TAF fehérjék egy része alkotja a SAGA komplexet (Spt-Ada-Gcn5 Acetiltranszferáz; ld. 3.7.3. fejezet), mely a kromatinstruktúra módosításával a génexpressziót szabályozza, egyben koaktivátorként is működik. Látható, hogy a TAF fehérjék sokoldalúan szabályoznak, nem csak a TFIID-re specifikusak (lásd Woychik és Hampsey, 2002 áttekintő munkája).

A Pol II transzkripciós komplexhez nem tud minden transzkripciós faktor közvetlenül kapcsolódni, legyen az aktiváló vagy gátló funkciójú. A specifikus faktorok és az RNS Polimeráz II közti kapcsolatot a Mediátor komplex (ld. 3.7.2. fejezet) teremti meg, amely számos

koaktivátor fehérjéből álló komplex (bővebben: Woychik és Hampsey, 2002 összefoglalója).

3.7.2. A Mediátor komplex

A Mediátor komplexet a *S. cerevisiae* élesztőgombánál írták le először (Kim és mtsi, 1994). A komplexet felépítő fehérjéket Med fehérjéknek, génjeiket *MED* géneknek nevezték el. Később más fejlettebb szervezetekben, köztük az emberben is, felfedezték a komplexet. Mivel a különböző fajokban a Mediátor alegységek elnevezései igen zavarosak voltak, ezért egységesítették azokat (Bourbon és mtsi, 2004).

Más eukarióták Mediátor komplexéhez hasonlóan a *Sch. pombe* Mediátor sem képes közvetlenül hozzákötödni specifikus DNS szakaszokhoz; fizikai kölcsönhatásba lép a Pol II legnagyobb alegységének foszforilálatlan CTD-jével (Carboxy-Terminal Domain), így létrehozva egy holoenzimet (Spahr és mtsi, 2003). Általánosságban elmondható, hogy a holoenzimhez kapcsolt Mediátor konformáció csak átmeneti állapot; a transzkripció elongációjának kezdetén az RNS polimeráz II leválik a Mediátor komplexről, majd kezdetét veszi a transzkripció (általános összefoglaló: Casamassimi és Napoli, 2007).

A *S. cerevisiae* élesztő Mediátor komplexe az eddigi ismeretek alapján 21 alegységből áll. A különböző alegységek eltérő aktivátor doménekkel lépnek kapcsolatba, ezért a kutatások az egyes alegységek egyedi leírására koncentrálnak. A komplex négy eltérő fizikai molekulára osztható: feji, középső, farki és CDK egységekre. A CDK modul a Mediátor represszáálásában játszik szerepet. Amikor egy koaktivátor kötődik a Mediátor fark részéhez, a CDK disszociál a komplexről, majd a feji rész a Pol II-vel és egyéb fehérjékkel együtt a DNS közelébe kerül,

melyet követően a Pol II megkezdí transzkripciós aktivitását (lásd Casamassimi és Napoli, 2007 áttekintő munkáját).

Sch. pombe hasadóélesztőnél is találtak a komplex alegységeivel homológ fehérjéket (ld. dolgozat 3.5. fejezete) és a komplexet magát is azonosították, mely kisebb a *S. cerevisiae*-ben található nál (Spahr és mtsi, 2000 és 2001). A *sep10/med31*⁺ és *sep11/med18*⁺ nem esszenciális gének; deléciójuk esetén rövid hifás morfológiájú sejteket figyelhetünk meg, melyek permisszív hőmérsékleten hosszabb generációs idejűek, majdnem teljesen sterilek, valamint alacsony vagy semmilyen spórázási képességgel nem rendelkeznek (Grallert és mtsi, 1999). A kettős mutáns ezzel szemben nem életképes (Szilágyi és mtsi, 2002). A *sep15/med8*⁺ deléciója önmagában is letális a sejt számára, míg a *sep15/med8-598* mutáns hőmérséklet-érzékeny (33°C felett életképtelen), a gátló hőmérséklethez közeli hőmérsékleten pedig szeparációban sérült fenotípust mutat (Grallert és mtsi, 1999; Zilahi és mtsi, 2000; Lee és mtsi, 2005; Miklós és mtsi, 2008).

A fenti Mediátor mutánsok vizsgálata rámutatott arra, hogy a gének pleiotrópok, azaz hatásuk több, egymástól független sejttani folyamatra is kihat. Így például a citokinezisre, az ivari differenciálódásra vagy a környezeti változásokra adott válaszokra. Ez a transzkripció szabályozásán keresztül történik, melyben mint koaktivátorok vesznek részt. A *sep10/med31*⁻ és *sep15/med8*⁻ mutánsokkal végzett microarray vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a *sep10/med31*⁺ és *sep15/med31*⁺ gének számos gén transzkripciójáért felelősek, többek közt a *sep1*⁺ és az *ace2*⁺ gének expressziójának aktivátorai is és így a sejtek normális kimenetelű osztódásában nélkülözhetetlenek (Miklós és mtsi, 2008; ld. 3.5. fejezet). Továbbá a *sep10/med31*⁺ és *sep11/med18*⁺ részt

vesznek az *aff1/ste11*⁺ gén expressziójának szabályozásában is (Szilágyi és mtsi, 2002), melynek génterméke a szexuális ciklus legfontosabb szabályozó molekulája.

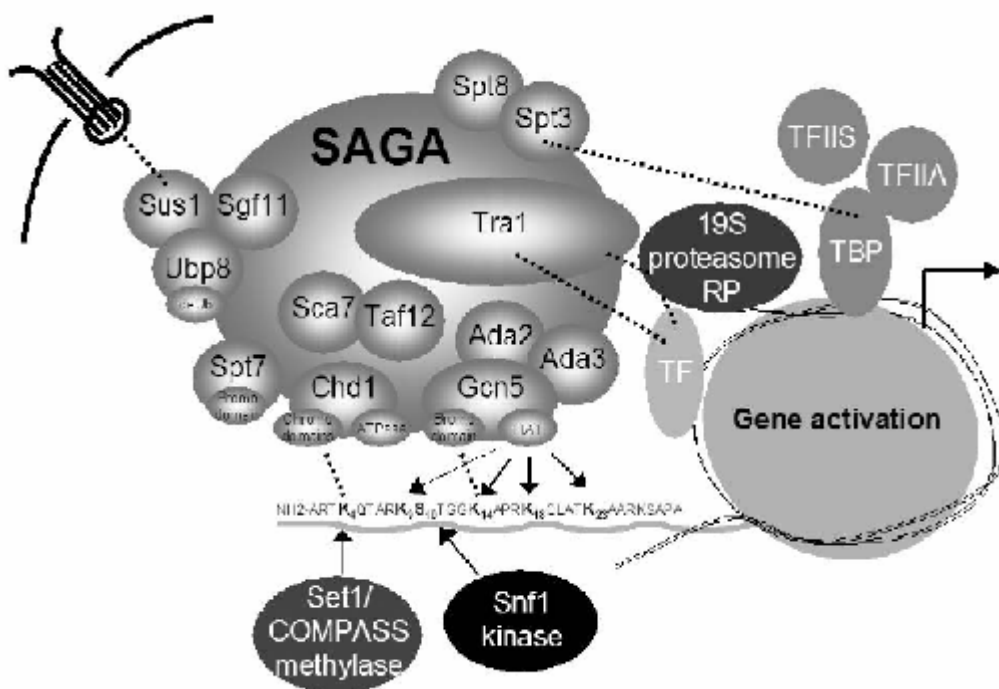
3.7.3. A SAGA komplex

Baker és Grant (2007), illetve Daniel és Grant (2007) a közelmúltban összefoglalta a SAGA komplexekről feltárt eddigi ismereteket. Munkájuk alapján a *S. cerevisiae* SAGA komplexéről az alábbiak mondhatók el.

A SAGA egy nagyméretű, kb. 1,8 MDa tömegű, a sejt igényei szerint dinamikusan össze- és szétszerelődő fehérjekomplexum, melynek számos funkciót tulajdonítanak: leginkább a transzkripció indítása során fejti ki szabályozó szerepét a hisztonfehérjék N-terminális túlnyúló végeinek modifikációival (acetiláció, metiláció, deubiquitinálás és foszforiláció), de ezeken túl még az elongációban, mRNS exportban és valószínűleg a DNS javításban is részt vesz. Az evolúció során olyannyira konzervatívnak bizonyult, hogy a *S. cerevisiae* SAGA komplexének megfelelő, homológ alegységekből felépülő szabályozó komplex még az emberben is megtalálható. Mivel a SAGA komplex ilyen erősen konzervatív és nagyfokú hasonlóságot mutat a *Sch. pombe*-ben és a *S. cerevisiae*-ben, az alábbiakban az utóbbi faj SAGA komplexének jellemzésére kerül sor. A *Sch. pombe* SAGA komplexéről kevés az irodalmi adat.

A *S. cerevisiae* SAGA komplexét felépítő alegységek közül tizenötöt ismernek. Alapvetően négy funkcionálisan elkülöníthető alegységcsoportra oszthatjuk e fehérjéket: transzkripciós adaptor fehérjék, Spt fehérjék, TAF alegység és Tra1 fehérje. Az adapter fehérjék közé az Ada proteinek tartoznak, valamint a Gcn5, amely a GNAT (Gcn5-rokon N-Acetiltranszferáz) szupercsaládba tartozó hiszton-acetiltranszferáz

(HAT) katalitikus alegység. A hisztonfehérjék közül legerősebben a H3-t acetilálja, ezen kívül a H4 és H2B acetilációjára is képes, de csak kisebb aktivitással. A Gcn5 önmagában nem képes a nukleoszómában lévő hisztonok acetilálására, csak a SAGA komplex részeként. Az Spt fehérjék némely tekintetben az Ada fehérjékhez hasonlítanak, a fő funkciójuk a TBP-vel való kapcsolat kialakítása. A TAF alegységet a Taf fehérjék építik fel, melyek a TBP-hez asszociálódva a SAGA acetilációs és transzkripció-aktivációs funkciójáért felelősek. A nagyméretű (kb. 400 kDa) Tra1 fehérje a SAGA szerkezetének kialakításában játszik szerepet, de emellett koaktivátor funkciója is van. Az *S. cerevisiae* SAGA komplex felépítése a **6. ábrán** látható.



6. ábra: A *S. cerevisiae* SAGA komplexének sematikus felépítése.

Forrás: Daniel és Grant, 2007.

A SAGA komplex legfontosabb funkciójának tehát a Gcn5-mediált hisztonacetiláció és a transzkripció aktivátorokkal való közvetlen kölcsönhatás tekinthető, melyek hatására beindul a transzkripció. Ezeken túl azonban az Ubp8-mediált hiszton-deubiquitinálás is a feladatkörébe tartozik, valamint egyelőre nem tisztázott szerepe van az mRNS exportjában és az elongációban is. Továbbá kölcsönhatásba lép a 19S proteoszómával, mely egy szabályozó képlet, és amelynek révén elősegíti a H3 trimetilációját. Az Ubp8 szintén hozzájárul a H3 trimetilációjához. A SAGA komplex további szabályozási lehetőségei közé tartozik az Sfn1-mediált H3 foszforiláció. A komplex acetillizin és metillizin felismerő képessége pedig hozzájárul a specificitásához és az aktivációjához, ugyanis e módosított aminosavak jelenléte nagymértékben növeli az aktivitását, így a hisztonok előzetes enzimatis módosítása meghatározza, hogy hol, melyik hisztonnál fejt ki a SAGA komplex aktiváló és regulatorikus hatását.

A *Sch. pombe*-ben eddig nem sikerült magát a SAGA komplexet biokémiaiailag izolálni, hanem szekvenciahomológiák alapján feltételezhető, hogy létezik. Eddig 3 gént és annak termékét azonosították: *spt3*⁺ (Madison és Winston, 1998), *sep9/spt8*⁺ (Grallert és mtsi, 1999; Helmlinger és mtsi, 2008), *gcn5*⁺ (Johnsson és mtsi, 2006). A doktori munka során a *sep9/spt8*⁺ részletes funkcionális analízisére került sor.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A doktori munka során felhasznált törzsek

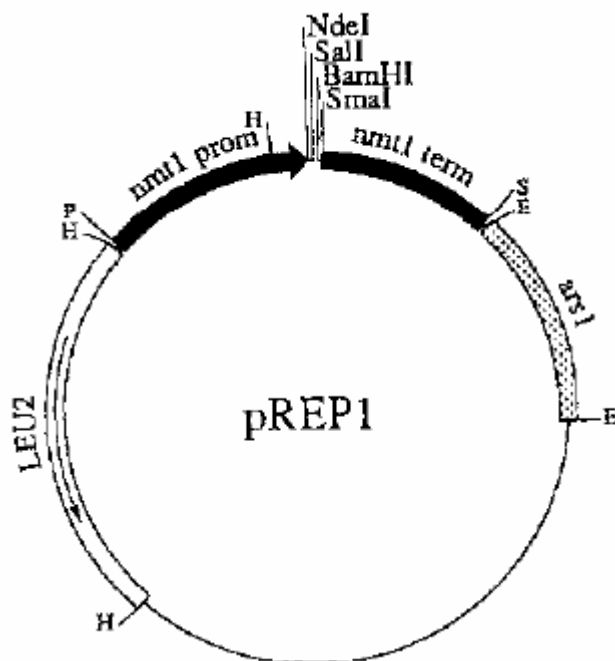
1. táblázat. *Sch. pombe*, *Sch. japonicus* és *E. coli* törzsek

Törzs	Genotípus	Forrás
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
0-1	Vad típus L972 h ⁻	U. Leupold, Bern
0-2	Vad típus L968 h ⁹⁰	U. Leupold, Bern
0-39	<i>leu1-32</i> h ⁻	U. Leupold, Bern
0-369	<i>ura4-D18</i> h ⁹⁰	J. Kohli, Bern
2-1310	<i>ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰	Ebben a tanulmányban 0-369 x 0-39
2-1043	<i>Δace2::kanMX4 ura4-D18</i> h ⁻	Martin-Cuadrado és mtsi, 2003
2-1042	<i>Δace2::kanMX4 ura4-D18 leu1-32</i> h ⁻	Martin-Cuadrado és mtsi, 2003
2-683	<i>sep9-307 ade3-58</i> h ⁹⁰	Grallert és mtsi, 1999
2-521	<i>sep9-307 ura4-D18</i> h ⁹⁰	Ebben a tanulmányban, 0-369 x 2-683
2-692	<i>sep9-307 ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰	Ebben a tanulmányban, 0-39 x 2-521
2-1053	<i>Δsep9::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰	Ebben a tanulmányban, 0-369-ből
2-1309	<i>Δsep9::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰	Ebben a tanulmányban, 2-1310-ből
2-1314	<i>sep9-307 Δsep10::ura4⁺ leu1-32 ade6-M26</i> h ⁹⁰	Ebben a tanulmányban, 2-692 x 2-922
2-989	<i>Δsep10::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰	Miklós és mtsi, 2008
2-922	<i>Δsep10::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M26</i> h ⁹⁰	Szilágyi és mtsi, 2002
2-898	<i>Δsep11::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰	Szilágyi és mtsi, 2002
2-896	<i>Δsep11::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰	Szilágyi és mtsi, 2002
2-991	<i>sep15-598</i> h ⁹⁰	Miklós és mtsi, 2008
2-870	<i>sep15-598 his3</i> h ⁹⁰	Miklós és mtsi, 2008
2-1300	<i>Δste11::ura4⁺ leu1-32</i> h ⁹⁰	Kjaerulff és mtsi, 1997
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>		
7-1	Vad típus (CCY 44-5-1=CBS 354)	Culture Collection of Yeasts, Pozsony
<i>Eschericia coli</i>		
DH5	<i>DH5 F⁻ (φ80dΔ(lacZ)M15) recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>	A. M. Carr, Anglia

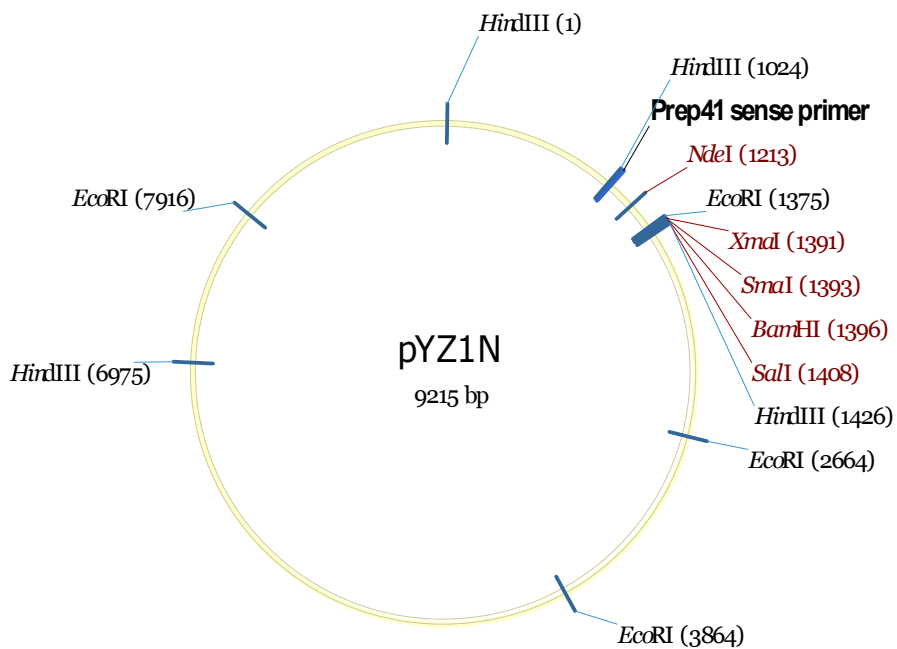
4.2. Felhasznált plazmidok

2. táblázat. A felhasznált plazmidok neve, leírása és származása.

Név	Leírás	Forrás
KS- <i>ura4</i> ⁺	az <i>ura4</i> ⁺ kazetta felszaporításához	Bähler és mtsi, 1998
pREP81- <i>ace2</i> ⁺	<i>ace2</i> ⁺ <i>nmt81</i> promóterhez fuzionálva; <i>leu1</i> ⁺ marker	Alonzo-Nuñez és mtsi, 2005
pSK85	<i>ste11</i> ⁺ <i>nmt41</i> promóterhez fuzionálva; <i>leu1</i> ⁺ marker	Kjaerulff és mtsi 2005
pYZ1N	<i>nmt1</i> alapú expressziós vektor	Zhao és mtsi, 1998
pYZ1NSjs9	pYZ1N-ből származó, <i>nmt1</i> promóterhez kapcsolt <i>Sch. japonicus</i> SJAG_02066.2 (<i>sep9</i> ⁺) ORF-et tartalmazó plazmid	Ebben a tanulmányban



7. ábra. Az ábrán a pREP1 vektor szerkezete látható. Valamennyi pREP típusú plazmid hasonló szerkezettel rendelkezik, csak a különböző erősségű „*nmt*” promóterekben különböznek. Forrás: Maundrell, 1993.



8. ábra. A feltételezett *Sch. japonicus sep9⁺* gén klónozásához használt pYZ1N expressziós vektor, mely hasonló szerkezettel rendelkezik, mint a pREP típusú plazmidok.

4.3. A doktori munka során használt PCR primerek

3. táblázat. Primerek neve, szekvenciája (5'-3') és leírása. A leírásban szereplő számok, a génben lévő vagy a génhez viszonyított helyzetüket jelzi. Ahol nincsenek számok feltüntetve, ott a primerek teljes gének felszaporításához kerültek felhasználásra.

Primer neve	Primer szekvenciája	Leírás
sep9KOFW	5'- GGA ACG TAA ACA AAA CAT ATT GTT GCT GCA TTG CAG CAT TTT AAG GTT ACA ACT CTT TTT GTG TAT ATT TTA AAG CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'	forward primer <i>sep9</i> ⁺ delécióhoz, dőlt betű: gén előtti régióval homológ -75-től -1-ig, egyenes betű: KS- <i>ura4</i> ⁺ kazettával komplementer szakasz
sep9KORW	5'- AAT CGT AAC CCA CTT CCT TTC AGT CTA TTA TCA TAA TGT ACA TTA TTG CGA ATA TGT GTT TTA GAG AAA GCA TTA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GA -3'	reverse primer <i>sep9</i> ⁺ delécióhoz, dőlt betű: gén utáni régióval homológ 1629-től 1703-ig, egyes betű: KS- <i>ura4</i> ⁺ kazettával komplementer szakasz
s9sl.2forw	5'- CCT TGT CAA ACT TCC CCA TTC -3'	<i>sep9</i> ⁺ génhez upstream forward primer; -296-től -276
KOura	5'- GCT ACA ATA TGC ATC TGG -3'	KS- <i>ura4</i> ⁺ kazettaszpecifikus reverse primer az integráció ellenőrzéséhez
s9forw1.1	5'- GCT GCA TTG CAG CAT TTT AAG -3'	<i>sep9</i> -307 szekvenáló forward primer; -51-től -30-ig
s9rev1	5'- GAA CCC AAA GAC CTC TGG -3'	<i>sep9</i> -307 szekvenáló reverse primer; 640-657
s9forw2	5'- TCT CTC CCT GAC TGT TGC -3'	<i>sep9</i> -307 szekvenáló forward primer; 509-526
s9rev2	5'- CCC ATA CAT TCA TAA CTC C -3'	<i>sep9</i> -307 szekvenáló reverse primer; 1167-1185
s9forw3	5'- TCT GTT CAA GCA AAT GAG GAG -3'	<i>sep9</i> -307 szekvenáló forward primer; 1032-1052
s9rev3	5'- CGT AAC CCA CTT CCT TTC -3'	<i>sep9</i> -307 szekvenáló reverse primer downstream; 54-71
s9oeforw	5'- CAT ATG GAA GCA GAA GAG AGT GAG TCC -3'	forward primer <i>sep9</i> ⁺ cDNS szekvenáláshoz
s9oerev	5'- GGA TCC CGA ATA TGT GTT TTA GAG AAA GC -3'	reverse primer <i>sep9</i> ⁺ cDNS szekvenáláshoz
sce3RTs	5'- GTG ACT GGG TTC GTC GTG -3'	<i>sce3</i> ⁺ forward primer RT PCR- hez; 784-801
sce3RTa	5'- GGC GCT CAG AGG ATT CAC -3'	<i>sce3</i> ⁺ reverse primer RT PCR- hez; 949-966
ace2RTleft	5'- TAA CAA TGA CGC ATT TTC CTT G -3'	<i>ace2</i> ⁺ forward primer RT PCR- hez; 411-432

ace2RTright	5'- TGT TGT TGA GAG TCC AGC TCA T -3'	<i>ace2</i> ⁺ reverse primer RT PCR- hez; 488-509
adgl_273-293F	5'- CCC AAC TAG CGC TAC TAC GAC -3'	<i>adgl</i> ⁺ forward primer RT PCR- hez; 273-293
adgl_356-375R	5'- AGT GTC CAC TGG CGG ATT AC -3'	<i>adgl</i> ⁺ reverse primer RT PCR- hez; 356-375
eng_1 1765- 1784F	5' GGC GAT TCT GAT ATG GAG GA -3'	<i>eng1</i> ⁺ forward primer RT PCR- hez; 1765-1784
eng_1 1851- 1870R	5'-TAG AAG TGG GCT GGA CGT TT -3'	<i>adgl</i> ⁺ reverse primer RT PCR- hez; 1851-1870
ste11RTleft	5'- TGT CAG CCG ATA AAG TGT TGT C -3'	<i>aff1/ste11</i> ⁺ forward primer RT PCR-hez; 860-880
ste11RTright	5'- GGT ATT CGG GGT TTT AGG TGA T -3'	<i>aff1/ste11</i> ⁺ reverse primer RT PCR-hez; 939-960
Sj.sep9s	5'- TAC GTA GTC ATA TGG ATG AGT CTG AAG TGG AAT TAG -3'	forward primer <i>Sch. japonicus</i> <i>sep9</i> ⁺ ortológ amplifikációjához és klónozásához; dőlt betű: +1-től 25-ig génnel homológ, vastag egyenes betű: <i>NdeI</i> RE hely, egyenes betű: aspcifikus szekvencia
Sj.sep9aBamHI	5'- TAC GTA GTG GAT CCT TAC GGG TTA GAA TTA ATA ACG -3'	reverse primer <i>Sch. japonicus</i> <i>sep9</i> ⁺ ortológ amplifikációjához és klónozásához; dőlt betű: a gén utolsó 22bp-jával homológ szakasz, vastag egyenes betű: <i>BamHI</i> RE hely, egyenes betű: aspcifikus szekvencia
Sj.sep9in	5'- ATC CCA TAA ATG CAC ATC ACG -3'	reverse primer a <i>Sch. japonicus</i> <i>sep9</i> ⁺ ortológjában; 685-705
Prep41sense	5'- GTC ATT CGG CAA TGT GCA GC -3'	forward primer a polylinker régiohoz képest upstream; klónozott gének integrációjának ellenőrzéséhez; 3509-3528
Sjs9RTs	5'- CCG TCT CTA ACG ATG AAA ACA CAC C -3'	<i>Sch. japonicus sep9</i> ⁺ ortológ forward primer RT-PCR-hez; 938-962
Sjs9RTa	5'- ATT TGG TTG CCG TTG GTC CC -3'	<i>Sch. japonicus sep9</i> ⁺ ortológ reverse primer RT-PCR-hez; 1025-1044

4.4. Felhasznált tápközegek, vegyszerek

4.4.1. Tápoldatok

4. táblázat. A hasadóélesztők tenyésztéshez felhasznált tápoldatok és táptalajok. Valamennyi tápoldat desztillált vízzel készül és autoklávvál sterilizzuk.

Tápoldat	Összetétel		Felhasználás
YEL (1000 ml); Sipiczki és Ferenczy, 1977	Glükóz Élesztőkivonat	30,0 g 10,0 g	Komplett
YEA (1000 ml); Sipiczki és Ferenczy, 1977	YEL Poragar	1000 ml 20,0 g	Komplett
EMML (1000 ml); Mitchison, 1970	C ₂ H ₂ KO ₄ Glükóz NH ₄ Cl Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O Sóoldat Fehér vitaminoldat Nyomelemoldat	3,0 g 20,0 g 5,0 g 5,55 g 20 ml 1 ml 0,1 ml	Szelektív
EMMA; Mitchison, 1970	EMML Poragar	1000 ml 20 g	Szelektív
SML (1000 ml); Sipiczki és Ferenczy, 1977	(NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ × 7 H ₂ O Glükóz Sárga vitaminkeverék	3,0 g 1,0 g 0,5 g 10,0 g 1 ml	Szelektív
1,2 M szSML (1000 ml); Sipiczki és Ferenczy, 1977	SML Szorbit	1000 ml 218,6 g	Szelektív
1,2 M szSMA; Sipiczki és Ferenczy, 1977	szSML Poragar	1000 ml 20,0 g	Szelektív
1%-os szSMA (fedőagar); Sipiczki és Ferenczy, 1977	szSML Poragar	1000 ml 10,0 g	Szelektív
MSL (1000 ml); Egel és mtsi, 1994	Glükóz Arginin-monohidroklorid KH ₂ PO ₄ NaCl MgSO ₄ × 7 H ₂ O CaSO ₄ × 2 H ₂ O Nyomelemoldat Biotinoldat Fehér vitaminoldat	10,0 g 2,0 g 1,0 g 0,1 g 0,2 g 0,1 g 1 ml 1 ml 2 ml	Spórázató
MSA; Egel és mtsi, 1994	MSL Poragar	1000 ml 20,0 g	Spórázató

5. táblázat. Baktérium sejtek tenyésztéséhez felhasznált tápoldatok és táptalajok. Valamennyi tápoldat desztillált vízzel készül és autoklávval sterilizzuk.

Tápoldat	Összetétel		Felhasználás
LB (1000 ml); Sambrook és mtsi, 1989	Glükóz Bacto trypton Élesztőkivonat	10,0 g 10,0 g 5,0 g	Komplett
LBA; Sambrook és mtsi, 1989	LB Poragar	1000 ml 12,0 g	Komplett

6. táblázat. Tápközegekhez felhasznált oldatok összetétele. Valamennyi oldat desztillált vízzel készül. A biotinoldat kivételével sterilizzuk az oldatokat.

Tápközegeket alkotó oldatok	Összetétel		Felhasználás
Sóoldat (1000 ml)	MgCl ₂ × 6 H ₂ O CaCl ₂ × 2 H ₂ O KCl Na ₂ SO ₄	53,3 g 0,735 g 50,0 g 2,0 g	EMML, EMMA
Fehér vitaminoldat (100 ml)	Nikotinsav Inozitol Biotin Pantoténsav	1,0 g 1,0 g 1,0 mg 100,0 mg	EMML, EMMA, MSL, MSA
Nyomelemoldat (1000 ml)	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ × 4 H ₂ O ZnSO ₄ × 7 H ₂ O FeCl ₃ × 6 H ₂ O MoO ₄ × 2 H ₂ O KI CuSO ₄ × 5 H ₂ O Citromsav	5,0 g 4,47 g 4,0 g 2,0 g 1,6 g 1,0 g 0,4 g 10 g	EMML, EMMA, MSL, MSA
Sárga vitaminkeverék (100 ml)	Fólsav Biotin Ca-pantotenát Inozitol Niacin Para-aminobenzoésav Piridoxin-HCl Tiamin Riboflavin	0,2 mg 0,2 mg 40,0 mg 200,0 mg 40,0 mg 20,0 mg 40,0 mg 40,0 mg 20,0 mg	SML, szSML, szSMA, fedőagar
Biotinoldat (1000 ml)	Biotin Desztillált víz Abszolút etanol	10,0 g 500 ml 500 ml	MSL, MSA

7. táblázat. Tápközegek kiegészítései.

Tápközeg kiegészítések		Felhasználás
Ampicillin (50 mg/ml törzsoldat)	100 µl 100 ml tápfolyadékba	LB+ampicillin
Tiamin (50 mg/ml)	100µl 100ml tápfolyadékba	EMM+tiamin
Aminosav kiegészítések (leucin)	7,5 mg 100 ml tápoldatba	Szelektív tápközegek
Nukleobázis kiegészítések (uracil)	5,0 mg 100 ml tápoldatba	Szelektív tápközegek

4.4.2. Oldatok

8. táblázat. Kísérletekhez használt oldatok. A DISH II. kivételével minden oldat autoklávval sterilizálendő.

Oldatok	Összetétel		Felhasználás
0,5 M EDTA (pH=8.0)	EDTA NaOH Millipore MilliQ víz	25,0 g 186,1 g 1000 ml	TE, TBE, DISH I.
1 M TRIS	Tris klorid Millipore MilliQ víz	121,4 g 1000 ml	DISH I.
10x TE	0,5M EDTA 1M TRIS Millipore MilliQ víz	2 ml 10 ml 88 ml	DNS izolálás, transzformálás
10x TBE puffer	TRIS klorid Bórsav 0,5M EDTA Millipore MilliQ víz	109,0 g 55,6 g 40 µl 1000 ml	Gélelektroforézis
10% SDS	SDS Desztillált víz	10,0 g 100 ml	DISH II.
10 M NaOH	NaOH Desztillált víz	40,0 g 100 ml	DISH II.
DISH I.	1M TRIS 0,5M EDTA Glükóz Desztillált víz	25 ml 20 ml 8,92 g 955 ml	Plazmid DNS izolálása
DISH II. (frissen előállítandó)	10M NaOH 10% SDS Desztillált víz	200 µl 1 ml 8,8 ml	Plazmid DNS izolálása
DISH III.	Kálium acetát Jégecet Desztillált víz	290,0 g 115 ml 285 ml	Plazmid DNS izolálása

9. táblázat. Kísérletekhez használt oldatok. A Lítium acetát/TE, ami már eleve steril oldatok elegye, és az 1%-os agaróz kivételével valamennyi oldat autoklávval sterilizálandó.

Oldatok	Összetétel		Felhasználás
5 M Kálium acetát	Kálium acetát Desztillált víz	49,07 g 100 ml	Genomiális DNS izolálása
1,2 M Szorbitoldat	Szorbit Desztillált víz	218,4 g 1000 ml	Szomatikus sejthibridizáció, elektroporálás
30% PEG6000	PEG6000 Desztillált víz	30,0 g 100 ml	Szomatikus sejthibridizáció
0,1 M CaCl ₂	CaCl ₂ Desztillált víz	11,0 g 1000 ml	Szomatikus sejthibridizáció
0,65 MKCl	KCl Desztillált víz	48,46 g 1000 ml	Szomatikus sejthibridizáció
1 M Lítium acetát	Lítium acetát Desztillált víz	6,6 g 100 ml	Élesztők transzformálása
Lítium acetát/TE (frissen készítendő); Keeney és Boeke, 1994	10x TE 1M Lítium acetát Steril desztillált víz	1 ml 1 ml 8 ml	Élesztők transzformálása
PEG4000/Lítium acetát/TE; Keeney és Boeke, 1994	PEG4000 1M Lítium acetát 10x TE Desztillált víz	8,0 g 2 ml 2 ml 9,75 ml	Élesztők transzformálása
1%-os agaróz	Agaróz 1x TE	4 g 400 ml	Gélelektroforézis
DEPC víz	Dietil-pirokarbonát Millipore MilliQ víz	1 ml 999 ml	RNS izolálás, cDNS szintézis

4.5. Alkalmazott kísérleti módszerek

4.5.1. *Sch. pombe* klasszikus genetikai és mikrobiológiai módszerei

A klasszikus genetikai módszereket a Gutz és mtsi (1974), illetve Alfa és mtsi (1993) által leírtak alapján végeztük, így a hagyományos keresztezéseket és a tetrádanalízist is. A felhasznált törzsek listája a 4.1. fejezetben található, a felhasznált táptalajok és oldatok összetételeit a 4.4. fejezetben ismertettük (YEL, YEA, SML, SMA: Sipiczki és Ferenczy, 1977; EMMML, EMMA: Mitchison, 1970; MSL, MSA: Egel és mtsi, 1994). A sejtek tenyésztése során a szelektív táptalajok 50-75 µg/ml nukleotid és/vagy aminosav kiegészítőket tartalmaztak. Tiamin represszált vizsgálatokban („*nmt*” promóter) 1 µl, 50 mg/ml koncentrációjú tiamin (Sigma, T4625) törzsoldatot használtunk fel 1ml tápközeghez.

Csepegtetési növekedési vizsgálatokhoz a sejteket „log” fázisig növesztettük YEL-ben 30°C-on, majd valamennyi sejt kultúrát 0,5 értékű optikai denzitásra (továbbiakban OD) állítottuk és tízszeres hígítási sort készítettünk. Ezt követően 5-5 µl-eket kicsepegtettünk a táptalajokra, s a keletkező telepeket 4 napos inkubációt követően vizsgáltuk 25°C, 30°C, 37°C hőmérsékleteken. A kísérleteket két párhuzamossal és egy ismétléssel készítettük. Növekedési tesztet folyékony tápközegben is végeztünk, de csak 25°C és 30°C hőmérsékleteken, ekkor OD=0,1 kezdeti értékű tenyészetekből indultunk ki, és óránként mintavételeztünk. A spórázások vizsgálatát MSA táptalajokon végeztük: 5-5 µl tenyészetet csepegtettünk ki a táptalajokra és 3-6 nap elteltével vizsgáltuk a sejteket. Az OD értékek mérése 590 nm-en történt, Beckman Du-50 spektrofotométerrel.

A *sep9⁻*, *sep10⁻*, *sep11⁻*, és *sep15⁻* törzsek sterilitása megakadályozta azok bármely más törzzsel történő hagyományos keresztezését, ezért ezen törzsek keresztezéseit szomatikus sejthibridizálással (protoplaszt fúzió) végeztük (Sipiczki és Ferenczy, 1977). A sejteket YEL-ben log fázisig növesztettük majd lecentrifugáltuk azokat (4000 rpm, 5 perc), és a sejteket 5 ml 0,65 M KCl oldattal átmostuk. Az újabb centrifugálást (4000rpm, 5 perc) követően a sejteket 3 ml, 4 mg/ml 0,65 M KCl-ban oldott lysing-enzimkeverék (Sigma, L1412) oldatban felszuszpendáltuk. A Lysing-enzimkeverék β -glükánáz és kitináz aktivitásának köszönhetően megemésztí a *Sch. pombe* sejtek sejtfalát, így szferoplasztok vagy hosszabb inkubációs idő esetén protoplasztok alakulnak ki. A protoplasztokat kialakulásuk után (kb. 30-60 perc) 5 ml 1,2 M szorbit oldattal kétszer átmostuk, mindkét mosás esetében 2000 rpm fordulatszámon, 5 percig centrifugáltunk. A második mosás előtt a fuzionálandó törzseket összekevertük 5 ml 1,2 M szorbitban. A második centrifugálás után a sejteket 30%-os PEG6000 és 0,1 M CaCl_2 9:1 arányú elegyének 2 ml-ével felszuszpendáltuk, majd 25 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezután a 2 ml protoplaszt szuszpenzióhoz 10ml 50°C-os 1% agart tartalmazó szSMA táptalajt (fedőagar) adtunk. Óvatos keverés után az összes mennyiséget három csésze szSMA táptalajra szélesztettük ki, majd az üveg falára tapadt sejteket újabb 10 ml fedőaggarral lemostuk, és ezt is további három csésze szSMA-ra öntöttük. 6-10 napos inkubálás (30°C-on) után a fúziós termékek megjelentek, telepeket formálva a fedőagarban, ahonnan minimál táptalajra (SMA) izoláltunk néhány különálló telepet.

4.5.2. Molekuláris biológiai módszerek

Az alapvető DNS módszerek alkalmazásai Sambrook és mtsi (1989), illetve Moreno és mtsi (1991) leírásai alapján történtek. A DNS és RNS mintákat valamennyi esetben gélelektroforézissel ellenőriztük: 120 V, 1%-os agaróz gél, 1x TBE puffer és 1 kb DNS „létra” (Fermentas, SM0311). A restriktációs emésztéseket, ligálásokat a gyártók javaslatai alapján végeztük. A szükséges nukleinsav koncentrációk mérését Thermo Scientific NanoDropTM 1000 Spectrophotometer műszerrel végeztük.

4.5.2.1. Genomiális DNS (gDNS) izolálása

A sejteket 2 ml YEL-ben növesztettük, majd lecentrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc) azokat, vízzel átmostuk, majd 0,5 ml 4 mg/ml koncentrációjú lysing-enzimkeverékkel 45-60 percig emésztettünk. Ezt követően a sejteket lecentrifugáltuk (10000 rpm, 10perc) és az üledéket 450 µl 5x TE, 50 µl 10%-os SDS és 175 µl 5 M kálium-acetát elegyében felfuszpendáltuk. Ismét centrifugáltunk (10000 rpm, 10 perc) és a felülúszót azonos mennyiségű 2-propanollal (Spektrum 3D, 3.16085) összekevertük, majd 20 percig -20°C-on tároltuk, majd újra centrifugáltunk (10000 rpm, 10 perc) és az üledéket 350 µl 1x TE-ben felfuszpendáltuk és 300 µl fenol:kloroform:izo-amilalkoholt (25:24:1; Sigma, 77617) adtunk még hozzá. Ismételten centrifugálás következett (10000 rpm, 10 perc) és az elváló, tiszta felső fázist átpipettáztuk és 30 µl 3 M nátrium-acetátot (Sigma, S7899), illetve 750 µl abszolút etanolt (Spektrum 3D, 3.05032) adtunk hozzá, majd -20°C-on 20 percig tároltuk. Újabb centrifugálást követően az üledéket 70%-os etil-alkohollal mostuk és rövid szárítást követően az üledéket 30 µl 1x TE-ben vettük fel és 2 µl 10 mg/ml koncentrációjú RNáz enzimet (Sigma, R5000) adtunk hozzá. 15

percen keresztül 65°C-on inkubáltunk, hogy az RNS tartalomtól megszabaduljunk és -20°C-ra helyeztük későbbi felhasználás céljából.

4.5.2.2. Plazmid DNS izolálása

Valamennyi plazmid (ld. 2. táblázat) izolálása az alábbiak szerint történt. A plazmidokat tartalmazó baktériumokat 1 éjszakán keresztül 3 ml ampicillines (ampicillin: 50 mg/ml törzsoldatból 1 µl/ml) LB tápfolyadékban tenyésztettük. A tenyészetet lecentrifugáltuk (10000 rpm, 5 perc) és az üledéket 100 µl DISH I-ben vettük fel, majd 200 µl DISH II-t és 150 µl DISH III. adtunk hozzá és összekevertük. 10 percig 10000 rpm fordulatszámon centrifugáltunk és a felülúszót 1 ml abszolút etanolba vittük. Ezt követően -20°C-on 20 percig tároltuk a szuszpenziót, majd ismét centrifugáltunk (10000 rpm, 10 perc). Végül az üledéket 70%-os etanollal mostuk és rövid szárítást követően felvettük 30 µl 1x TE-ben, mely 2 µl 10 mg/ml koncentrációjú RNázt is tartalmazott és 15 percig 65°C-on inkubáltuk, majd -20°C-ra helyeztük későbbi felhasználásra.

4.5.2.3. RNS izolálása

Az expressziós szintek vizsgálatához teljes RNS-t izoláltunk, melyet Chomczynski és Sacchi (1987) leírása alapján hajtottuk végre az alábbiak szerint. A tenyésztést követően a sejteket lecentrifugáltuk, majd DEPC (di-etil-pirokarbonát, Sigma D5758) tartalmú vízzel átmostuk azokat és egy éjszakán keresztül -70°C-on tároltuk. Másnap a sejtekhez 750 µl trizolt (TRI Reagent; Sigma, T9424) és 75 µl kloroform:izo-amilalkohol elegyet (5:1; Sigma, C0549) adtunk és alaposan összekevertük. 5 percig jégen tároltuk a sejtszuszenziókat, majd 15 percig 10000 rpm fordulatszámon centrifugáltunk. A felülúszóból 500 µl-t 500 µl

izopropanolhoz adtuk és 15 percig jégen tároltuk és ismét centrifugáltunk (10000 rpm, 15 perc), az üledéket 70%-os etanollal mostuk, majd a szárított üledéket DEPC-et tartalmazó vízben vettük fel és -70°C-on tároltuk a további felhasználásig. Felhasználás előtt DNáz enzimmal (Fermentas, EN0521) kezeltük a gyártó által javasolt leírás szerint.

4.5.2.4. PCR (polimeráz láncreakció)

A tanulmány során többféle PCR reakcióparamétert használtunk, melyek konkrét felhasználásai, az 5. Eredmények fejezetben kerülnek bővebben kifejtésre. Minden reakcióban a primerpárok T_m -jét vettük figyelembe és ha kb. azonosak voltak akkor $T_m - 5^\circ\text{C}$ -on volt a kapcsolási hőmérséklet. Egyes esetekben viszont a primerpárok között több $^\circ\text{C}$ -os különbségek is voltak, ilyenkor egy köztes megoldást kerestünk. Valamennyi esetben a Fermentas Taq polimeráz rendszert (EP0402), a Fermentas dNTP keveréket (R0181), és 500-1000ng templátot használtunk. A reakciókhoz használt készülékek: MJ Research Minicycler PTC150 és ABI 2720 Thermalcycler.

PCR reakció paramétereit:

1. lépés: 94°C 1'
2. lépés: 30 ciklus -- 94°C 30", primer $T_m - 5^\circ\text{C}$ 1', 72°C 0,5-2' (az amplikon méretétől függően)
3. lépés: 72°C 10'

Összetétel:

5 µl Taq polimeráz puffer, 4 µl MgCl₂, 2 µl 5mM dNTP, 1 µl templát (~1 µg DNS), 2-2 µl 20 µM forward és reverse primer, 0,5 µl Taq DNS polimeráz és 35,5 µl DNáz mentes víz.

Felhasználásig -20°C-on tároltuk a mintákat.

4.5.2.5. Reverz transzkripció (cDNS szintézis)

Valamennyi reverz transzkripciót az ImProm-II reverz transzkriptáz rendszerrel (Promega, A3802) hajtottuk végre. Minden esetben 1 µg RNS-t (ld. 4.5.2.3.) használtunk fel templátként. A reakciókhoz használt készülék: MJ Research Minicycler PTC150. A cDNS szintézise 2 lépésben történt:

1. 2 µl reverz primer (5 µM törzsoldatból) + 1 µg RNS (x µl) + DEPC tartalmú víz (10-2-x µl) reakció elegy készítése, majd 70°C-on melegítettük 5 percig, ezután pedig jégre helyeztük a mintákat.
2. A 10 µl-es reakcióelegyhez 1 µl reverz transzkriptázt, 4 µl puffert, 0,8 µl 5mM dNTP-t és 0,6 µl RNáz inhibitor (Promega, N2111). Majd a reakcióelegyet 10 percig 40°C-on és ezt követően 80 percig 50°C-on melegítettük. Felhasználásig -20°C-on tároltuk a mintákat.

4.5.2.6. Kvantitatív real-time PCR

Valamennyi génexpressziós vizsgálathoz a Bio-Rad iQ5 készüléket használtuk. Minden esetben az eredményeket a *Sch. pombe sce3⁺* háztartási gén expressziós szintjére normalizáltuk és legalább két különböző biológiai minta cDNS-ét (RNS-ét) használtuk fel. Templátként

a standard görbe elkészítésének esetében 0-1 *L972h⁻* vad típusú törzsből izolált gDNS-t használtuk, minden más esetben a 4.5.2.5. fejezetben leírtak szerint előállított cDNS szolgált templátként. Minden esetben triplikátumokkal dolgoztunk és a standard görbéket két párhuzamos, négyelemű tízszeres hígítási sor eredményeiből képeztük.

A reakció paraméterek a következők voltak valamennyi reakció esetében: 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 70-8882) reagens, 0,05-0,05 µl forward és reverse primer (100 µM törzsoldatból; 0,2 µM végkoncentráció), 4 µl cDNS templát és 8,4 µl víz. A reakciók kondíciói a következők voltak:

1. lépés: 94°C 5'
2. lépés: 40 ciklus -- 94°C 30'', 57°C 30'', 72°C 30''
3. lépés: 72°C 5'.

Továbbá olvadási görbéket („melt curve”) is felvettünk minden kísérlet során, annak ellenőrzésére, hogy kizárólag csak megfelelő termékek keletkeznek. Ennek az előző reakciót követő lépései a következők:

4. lépés: 95x ciklus: 10'' minden ciklus 48°C-ről indulva 95°C -ig, 0,5°C-os hőmérsékletemeléssel minden ciklusban.

A kapott eredményeket a Bio-Rad iQ5 Optical System 2.0 verziószámú szoftverrel értékeltük ki.

4.5.2.7. Transzformálások

Baktériumok transzformálása

Minden esetben *E. coli DH5* sejteket transzformáltunk, melynek menete a következő volt. A sejteket jégre helyeztük, majd hozzájuk adtuk a kitisztított ligátumokat, és 30 percig jégen inkubáltuk a sejteket. Ezt

követően 42°C-ra helyeztük a sejteket 2 percre (hősokk) és végül a sejteket ampicillines LB táptalajra szélesztettük és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk, majd másnap a kinőtt telepek közül néhányat izoláltunk.

Sch. pombe sejtek lítium-acetátos transzformálása lineáris DNS fragmentummal

A *sep9Δ* deléciós törzsek előállításához használtuk ezt a Keeney és Boeke (1994) által leírt módszert. 20 ml YEL-ben (komplett tápoldat) növesztjük a sejteket egy éjszakán át, OD=0,5-ig ($=10^7$ sejt/ml), majd lecentrifugáltuk (4000 rpm, 5 perc). 20ml steril desztillált vízzel mostuk a sejteket (centrifuga 3000 rpm, 3 perc). A sejteket felvettük 1 ml steril desztillált vízben és mikrocentrifuga csőbe mostuk, és ismét centrifugáltunk (3000 rpm, 3 perc). Az üledéket frissen készített lítium-acetát/TE-vel mostuk (3000 rpm, 3 perc). Ezután a sejteket 100 µl lítium-acetát/TE-ben vettük fel. A szuszpenzióhoz hozzáadtunk 2 µl „carrier” DNS-t (10 mg/ml hering spermából izolált DNS; Sigma, D2251) és a transzformáláshoz szánt 10-20 µg DNS-t, amelyet 10 µl 1x TE-ben vettünk fel. A sejteket 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután 240 µl PEG4000/Li-acetát/TE-t adtunk a sejtekhez és 30-60 percig ismét inkubáltunk 30°C-on. Ezt követően 43 µl DMSO-t (Sigma, 154938) adtunk a sejtekhez és 5 perc hősokk következett 42°C-on. A sejteket steril desztillált vízzel mostuk, majd végül 0,5 ml vízben vettük fel azokat, és 5 darab megfelelő kiegészítővel ellátott EMMA szelektív táptalajra szélesztettünk 100-100 µl-t. A szelektív táptalajokat 30°C-os inkubátorba helyeztük és az 5-9 nap múlva megjelent telepeket izoláltuk.

Sch. pombe sejtek transzformálása elektroporátorral

Valamennyi plazmidokkal történő transzformáláshoz ezt a módszert alkalmaztuk. A transzformálandó törzseket 100 ml komplett tápfolyadékban tenyésztettük, 30°C-on OD=0,5-ig növesztettük, majd lecentrifugáltunk 20 ml-t (3000 rpm, 5 perc). A leülepedett sejteket 1 ml, jéghideg 1,2 M-os szorbittal átmostuk mikrocentrifuga csőbe és lecentrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc), majd kétszer megismételtük ezt a lépést. A sejteket végül annyi szorbitban vettük fel, hogy a sejtkoncentráció 10^9 sejt/ml legyen, ami jelen esetben 200 μ l szorbitoldatot jelent. Ezt követően 1 μ g plazmid DNS-t adtunk a sejtekhez, illetve 2 μ l 10 mg/ml koncentrációjú hering spermából nyert DNS-t is, mint „carrier” DNS-t. Ezt a szuszpenziót küvettába (Bio-Rad, 165-2082) vittük és végrehajtottuk az elektroporációt a Bio-Rad Gene Pulser X-cell készülékkel az alábbi, *Sch. pombe*-hez ajánlott gyári paraméterek szerint: 2300 V; kapacitás: 25 μ F; ellenállás: 100 Ω . Ezt követően 1 ml jéghideg szorbitot adtunk a szuszpenzióhoz, majd megfelelő kiegészítővel ellátott EMMA szelektív táptalajra szélesztettünk és 30°C-on inkubáltuk a sejteket 4-7 napon keresztül, míg telepek nem jelentek meg.

4.5.3. MPA (mikofenolsav) teszt

S. cerevisiae-ben a SAGA komplex nem csak a transzkripció elindításában, de az elongációs folyamatokban is részt vehet (ld. Baker és Grant összefoglaló cikkét, 2007). Korábban kimutatták, hogy számos *S. cerevisiae* SAGA alegységmutáns a vad típusú sejtekhez képest magasabb érzékenységet mutat az elongációt gátló mikofenolsavra. Ezen érzékeny mutánsok között található az *SPT8Δ* deléciós mutáns is

(Desmoucelles és mtsi, 2002). Ezért megvizsgáltuk vajon a *Sch. pombe* *sep9* génben sérült mutáns mutat-e a mikofenolsavval szemben bármiféle érzékenységet. A vizsgálatokat Desmoucelles és mtsi (2002) leírása alapján végeztük. A sejteket OD=0,5-ig növesztettük, majd a mikofenolsavat (Sigma, M5255) különböző mennyiségben (0; 0,02; 0,1 és 0,2 µg/µl végkoncentráció) tartalmazó komplett táptalajokra 10-10 µl-eket rácseppentettünk a tenyészetekből, és vizsgáltuk a telepképződést 4 napon keresztül.

4.5.4. Mikroszkópia

Olympus BH-2 és DX-40 mikroszkópokat használtunk a különböző törzsek vizsgálatához. A képeket Olympus DP-70 fényképezőgéppel készítettük és a hozzátartozó szoftvercsomaggal dolgoztuk fel.

4.6. Bioinformatikai módszerek

A *Sch. pombe* szekvenciákat a Sanger Institute által fenntartott és működtetett Gene DB adatbázisban (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>), míg a *Sch. japonicus* szekvenciákat a Broad Institute adatbázisában (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/MultiHome.html) kerestük meg. További szekvencia kereséseket az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és a Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/>) adatbázisaiban hajtottuk végre.

A páronkénti illesztéseket a NCBI Blast2 algoritmusának felhasználásával készítettük az NCBI oldalon (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). A többszörös illesztést a Clustal W algoritmust használó Clustal 1.8 verziószámú programmal

(Thompson és mtsi, 1994) végeztük el. A dendogramok a többszörös illesztések eredményeiből kiindulva készültek Fitch-Margoliash távolság alapú módszerrel, melyet a 3.54 verziószámú Phylip szoftver csomag magában foglal (Felsenstein, 2001). Bootstrap vizsgálatot (100 ismétlés; a Phylip csomag Seqboot és Consense alprogramjaival) is végeztünk annak érdekében, hogy felbecsüljük a családfa belső ágainak valószínűségi értékét. A családfákat a TreeView programmal jelenítettük meg (Page, 1996).

5. Eredmények

5.1. Az intron helyzetének meghatározása a *sep9*⁺ génben

A *sep9*⁺ gén klónozásának idején (Sipiczki és mtsi, 1999), még nem állt rendelkezésre a *Sch. pombe* teljes genomjának szekvenciája, ám ebben a tanulmányban sikerült beazonosítani a korábban klónozott gént a *Sch. pombe* ORF-eket tartalmazó genomadatbázisban, SPBC14C8.17c néven. E korábban még részleteiben nem jellemzett gén az adatai szerint feltételezhetően egy 47 nukleotid hosszúságú intront tartalmaz, mely az 56. nukleotiddal kezdődik. Annak érdekében, hogy ezt bebizonyítsuk, a *Sch. pombe* cDNS könyvtárát (ajándék Professzor Jimeneztől, Malagai Egyetem, Spanyolország) felhasználva, a **3. táblázatban** ismertetett s9oeforw és s9oerev primerekkel, a 4.5.2.4. fejezetben leírt PCR reakcióval felszaporítottuk az adott DNS szakaszt, majd azt szekvencia meghatározás céljából a Geneart AG céghez (www.geneart.com) elküldtük. A szekvencia elemzése során kiderült, hogy nem tartalmaz intront és összehasonlítva a *sep9*⁺ gDNS szekvenciával, utóbbi valóban rendelkezik egy intronszekvenciával, azonban nem az adatbázisban leírtak szerint, hanem az 57. nukleotidtól kezdődően, viszont a méretét mi is 47 nukleotid nagyságúnak találtuk (lásd **9. ábra**). Ugyanakkor ez az eltérés nem változtatja meg a Sep9 fehérje aminosav-szekvenciáját.

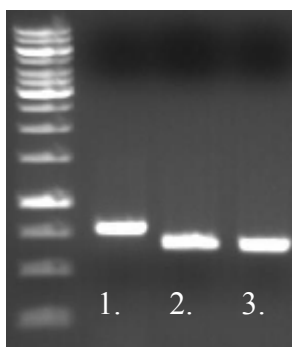
```
sep9 ORF      1  ATGGAAGCAGAAGAGAGCTGAGTCCTTTTCACATCCAAATGTGGCTAAGTTCTGAGCG-----
s9 n intron  1  ATGGAAGCAGAAGAGAGCTGAGTCCTTTTCACATCCAAATGTGGCTAAGTTCTGAGCGGTTCG
sep9 cDNA     1  -----CTAGTGTGGCTAAGTTCTGAGCG-----

sep9 ORF      57  -----ACTTTATCCAGAAGAAG
s9 n intron  61  TTTTATAAAGCAGATATCACTTCCTTACTGACTTCAAATCTAGCACTTTATCCAGAAGAAG
sep9 cDNA     24  -----ACTTTATCCAGAAGAAG
```

9. ábra. Az intron helyének meghatározása. Jól látható, hogy a cDNS szekvenciából hiányzik egy szakasz, mely az intronnak feleltethető meg. A cDNS eleje a szekvenálás pontatlansága miatt hiányzik.

5.2. A *sep9-307* törzsben található mutáció helyzetének meghatározása

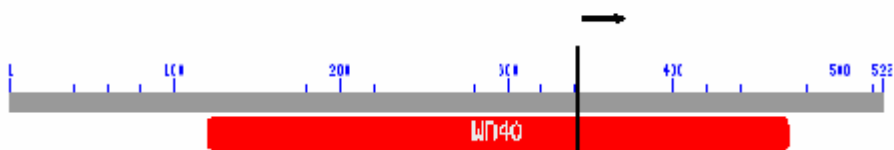
A *sep9-307* sejtekben található mutáció típusának és helyzetének meghatározása céljából, a 2-692 mutáns törzs sejtjeiből teljes gDNS-t izoláltunk (ld. 4.5.2.1. fejezet), majd három olyan primerpárt (ld. **3. táblázat**: s9forw1.1-s9rev1, s9forw2-s9rev2 és s9forw3-s9rev3) terveztünk a *sep9*⁺ génhez, mely teljesen lefedi a gént, és a különböző termékek részben egymással is átfedők. A három primerpár és a 2-692-ből izolált gDNS felhasználásával, a 4.5.2.4. fejezetben leírt PCR reakcióval három amplikont állítottunk elő (ld. **10. ábra**), melyeket szintén a Geneart AG céghez küldtünk el, hogy a szekvenciájukat



10. ábra. A szekvenáláshoz szükséges három PCR termék agarózképe.

meghatározzuk, majd a kapott nukletidsorrendeket a Cap3 (<http://host9.bioinfo3.ifom-ieo-campus.it/cap/>) program segítségével illesztettük össze. A kapott *sep9-307* mutáns szekvenciát összehasonlítottuk az adatbázisban fellelhető *sep9*⁺ szekvenciájával és azt találtuk, hogy a 2-962 *sep9-307* törzs *sep9* génjében egy deléciós pontmutáció keletkezett, mely kereteltolódáshoz és a 353. triplet stopkodonná változásához vezetett. Ez korai terminációt vont maga után a fehérjetranszláció során, mely a WD40 ismétlődő szakasz egy jelentős

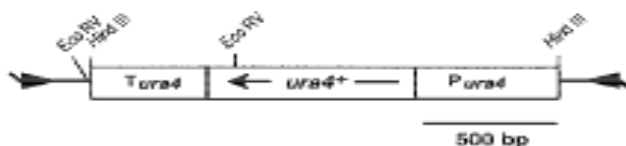
részét is érintette (ld. **11. ábra**). Ezt a csonkolt fehérje jelenlétét azonban kísérletesen még nem mutattuk ki, de azonosítása a későbbi munkáink szempontjából tervbe van véve..



11. ábra. A Sep9 translációjában bekövetkező korai termináció a *sep9-307* mutánsban. A nyíltól kezdődően hiányzik a fehérje. Az ábra az NCBI Blast szolgáltatásának segítségével készült.

5.3. A *sep9*⁺ deléciója

A *sep9*⁺ gén kiütését a kromoszómáról Bähler és mtsi (1998) által leírtak alapján végeztük el. Ennek során KS-*ura4*⁺ kazettát tartalmazó plazmidot (ld. **2. táblázat** és **12. ábra**) izoláltunk a 4.5.2.2. fejezetben ismertetett módon.

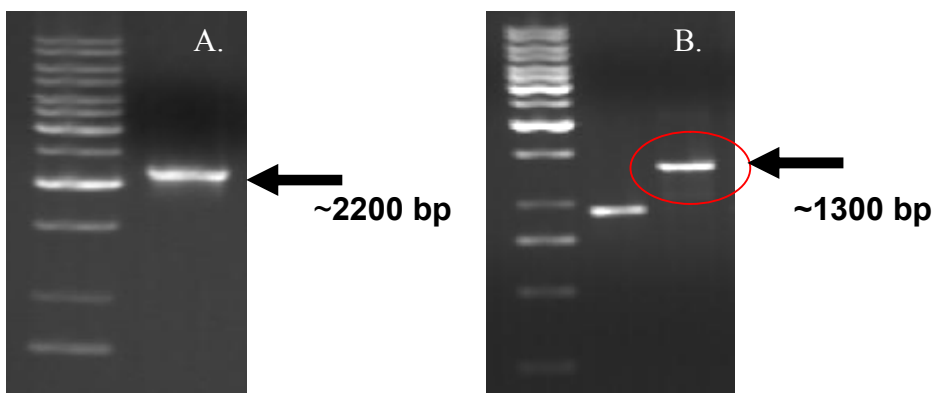


12. ábra. A *sep9Δ* deléciós mutáns előállításához használt *ura4*⁺ kazetta, melyet a KS-*ura4*⁺ plazmid tartalmaz. Forrás: Bähler és mtsi, 1998.

Ezt használtuk fel templátként egy olyan PCR reakcióban (ld. 4.5.2.4.), amelyben a heterológ *sep9KOFW* és a *sep9KORW* (ld. **3. táblázat**; egyenes nagybetű: olyan szekvenciák, melyek a plazmidszekvenciával komplementerek; dőlt nagybetű: olyan szekvenciák, melyek a *sep9*⁺ gént zárják közre) szolgáltak primerekként.

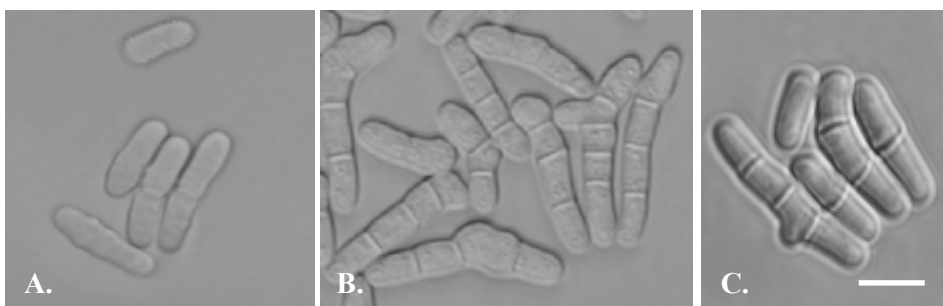
A keletkezett mintegy 2,2 kb nagyságú PCR terméket (ld. **13.A. ábra**) a 0-369, illetve a 0-39 és 0-369 törzsekből keresztezéssel előállított 2-1310 törzs transzformálásához (ld. 4.5.2.7.) használtuk fel, melyek uracil auxotróf mutánsok. A transzformálást követően a szelektív táptalajokon csak olyan telepek nőhettek, melyek az uracilra immáron prototrófok voltak. A kapott telepeket izoláltuk, majd pedig mikroszkóposan vizsgáltuk. A telepeket alkotó sejtek „sep” fenotípust mutattak és az előállított *sep9Δ* törzseket 2-1053, illetve 2-1309 törzsszámmal vezettük be gyűjteményünkbe.

További ellenőrzés céljából genomiális DNS-t izoláltunk a 2-1053 és 2-1309 törzsekből, a 4.5.2.1. fejezetben leírtak szerint. Ezt követően az izolált gDNS-t templátként használtuk abban a PCR reakcióban (ld. 4.5.2.4.), melyben a *sep9*szekv1.2 (*sep9*⁺-tól upstream szekvencia) és KOura (*ura4*⁺ specifikus szekvencia) primereket (ld. **3. táblázat**) alkalmaztuk. Az így keletkezett, mintegy 1,3 kb hosszúságú termék megerősítette, hogy az integráció helyes volt (ld. **13.B. ábra**), vagyis a *sep9*⁺ gén, *ura4*⁺-re lett lecserélve homológ rekombinációval.



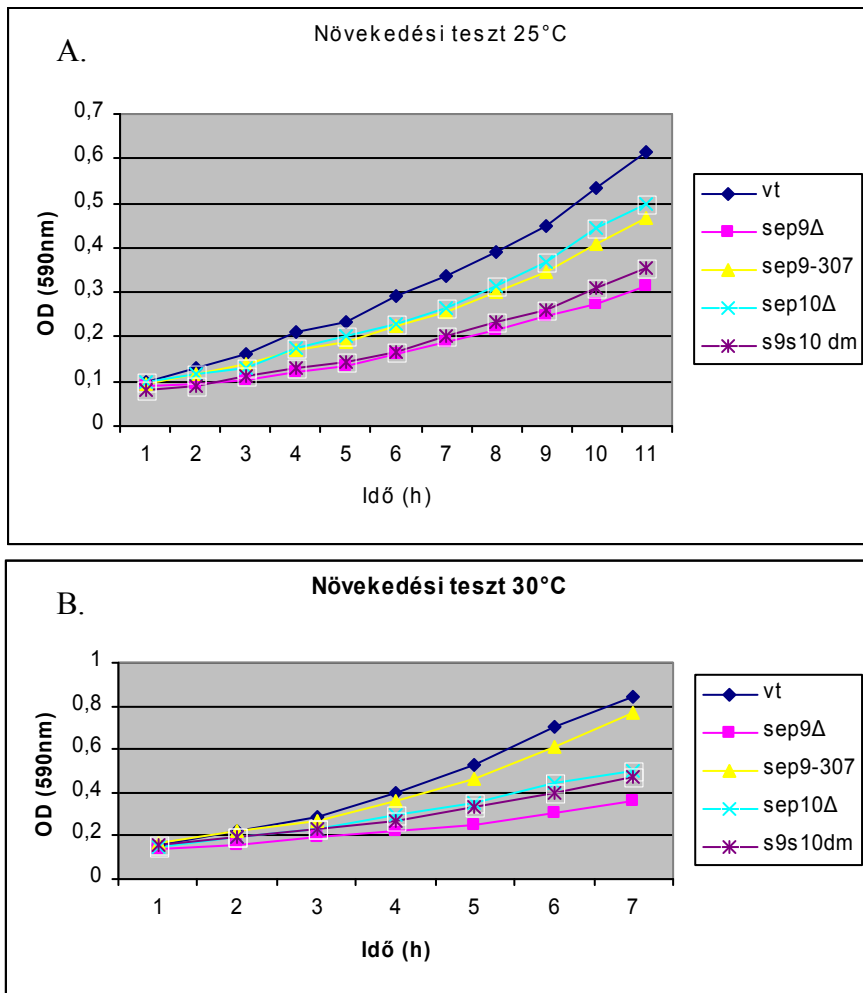
13. ábra. A *sep9Δ* törzsek előállításához szükséges PCR termékek. (A.) A *sep9Δ* deléciós konstrukció, amellyel transzformáltunk. (B.) A *sep9Δ* deléciós konstrukció beépülésének ellenőrzése. Pirossal bekarikázva, és nyíllal jelölve.

Ezt követően a *sep9Δ* deléciós mutáns törzseinket (2-1053 és 2-1309) alaposabb vizsgálatoknak vetettük alá (ld. 4.5.1.) és azt tapasztaltuk, hogy az UV generált *sep9-307* pontmutánsokhoz (Grallert és mtsi, 1999) hasonlóan, hifás fenotípust mutatnak (ld. **14. ábra**). Azonban a tenyészetek nem homogének, mivel a „sep” fenotípusú sejtek mellett vad típusúakat is láthatunk. Tehát a sejtszeparációs defektus csak részleges.



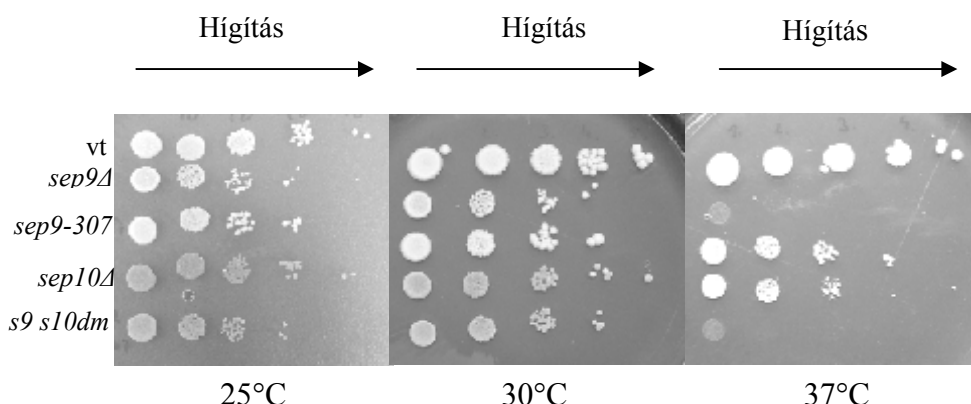
14. ábra. A *sep9*⁺ deléciójának hatása a sejtszeparációra. (A.) 0-1 vad típus törzs sejtjei; (B.) 2-692 *sep9-307* mutáns sejtek; (C.) 2-1053 *sep9Δ* deléciós mutáns sejtek. Méretvonal: 10 μm. A mikroszkópos felvételeken jól látható a vad típustól (A.) eltérő hifás fenotípus (B. és C.).

A *sep9*⁺ génben sérült mutánsok permisszív hőmérsékleten lassú növekedést mutatnak a 0-1 vad típusú törzshöz viszonyítva, 30°C-on ez a különbség a *sep9-307* esetében nem jelentős, aminek hátterében talán az lehet, hogy e sejtekben csonkolt fehérje azért képződik és lehetséges, hogy funkcióját részlegesen be tudja tölteni (ld. **15. ábra**). Ugyanakkor 37°C-on hőmérsékletérzékenységet tapasztaltunk: kicseppentést követően a telepképzés elmaradt (ld. **16. ábra**). Továbbá e törzsek képtelenek voltak az ivari differenciálódás folyamataira is: a konjugációra és aszkuszképzésre (ld. **3. ábra**, illetve **21.A. ábra**, amelyeken vad típusú sejtek által képzett aszkuszok láthatóak).



15. ábra. A *sep9*⁺ deléciójának hatása a sejtek szaporodására. A növekedési görbék azt mutatják, hogy a *sep9Δ* generációs ideje a leglassabb, illetve a *sep9-307 sep10Δ* kettős mutánsé is nagyon lassú. (A) 25°C (B) 30°C

vt = 0-1 vad típusú törzs; **sep9Δ** = 2-1053 *sep9Δ*; **sep9-307** = 2-692 *sep9-307*; **sep10Δ** = 2-922 *sep10Δ*; **s9s10dm**=2-1314 *sep9-307 sep10Δ* kettős mutáns

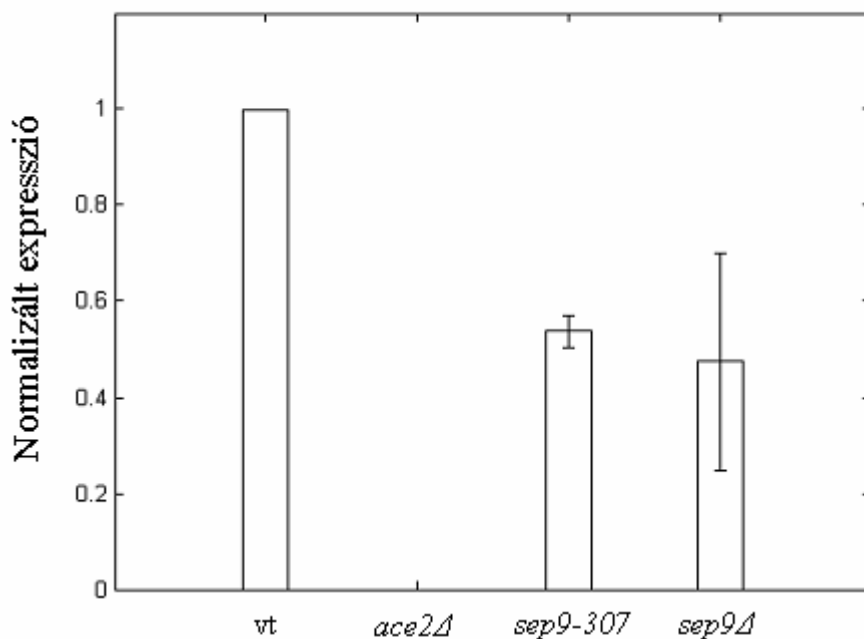


16. ábra. Növekedés vizsgálata komplett táptalajon. Jól látható a fényképeken, hogy a *sep9Δ* nem képez telepet 37°C-on, illetve a *sep9-307 sep10Δ* kettős mutáns sem. Valamennyi vizsgált mutáns mind 25°C-on, mind 30°C-on gyengébb növekedést mutat, mint a vad típusú törzs. vt = 0-1 vad típusú törzs; *sep9Δ* = 2-1053 *sep9Δ*; *sep9-307* = 2-692 *sep9-307*; *sep10Δ* = 2-922 *sep10Δ*; *s9 s10dm* = 2-1314 *sep9-307 sep10Δ* kettős mutáns.

5.4. A *sep9*⁺ mutációjának hatása a sejtszeparációban szerepet játszó gének transzkripciójára

A *sep9Δ* és *sep9-307* mutánsoknál tapasztalható összetett sejtszeparációs zavar azt sugallja, hogy a *sep9*⁺ inaktivációja több sejtszeparációban érintett gén aktivációját is érintheti. A sejtek szétválásában résztvevő gének központi szabályzó molekulája az Ace2 regulátor fehérje (Alonzo-Núñez és mtsi, 2005; Dekker és mtsi, 2006). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk vajon a *sep9*⁺ gén befolyásolja-e eme transzkripciós faktort kódoló gén expressziós szintjét, 2-1309 *sep9Δ*, 2-692 *sep9-307*, 2-1043 *ace2Δ* és 0-1 vad típusú törzsek sejtjeit „log” fázisig növesztettük komplett tápfolyadékban, majd a 4.5.2.3. fejezetben leírtak szerint RNS-t izoláltunk. Ezt követően a 4.5.2.5-ben

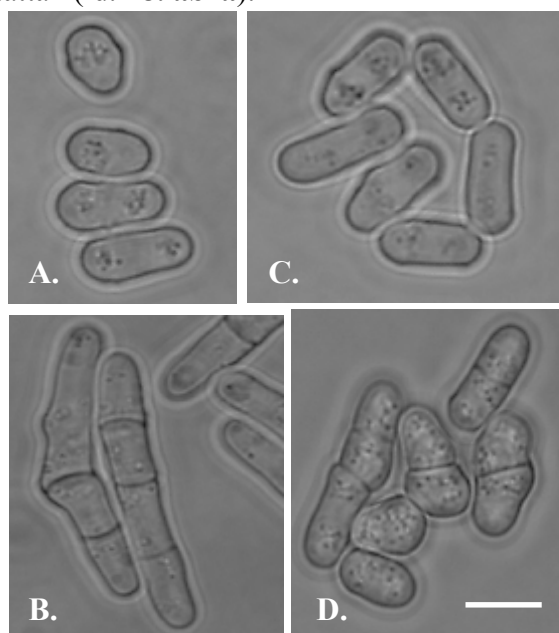
ismertetetteknek megfelelően cDNS szintézist hajtottunk végre az sce3RTa és ace2RTright primerekkel (ld. **3. táblázat**). Majd pedig a 4.5.2.6. fejezetnek megfelelően kvantitatív RT-PCR reakciót hajtottunk végre a sce3RTs-sce3RTa és ace2RTleft-ace2RTright primerpárokkal (ld. **3. táblázat**). Mindkét mutáns törzsünkben az *ace2*⁺ gén transzkripció szintje mintegy 50%-kal csökkent (ld. **17. ábra**), ami megfelel a korábban tapasztaltaknak, miszerint a mutáns törzseink tenyészeiben vegyesen találhatóak vad és mutáns fenotípusú sejtek is (ld. **14. ábra B. és C.**).



17. ábra. Az *ace2*⁺ gén transzkripció szintjének mérése. Jól látható, hogy a *sep9*⁻ mutánsokban mintegy felére csökkent az *ace2*⁺ gén aktivitása. Az *ace2*⁻ mutánsban nem volt mérhető az *ace2*⁺ mRNS szint.

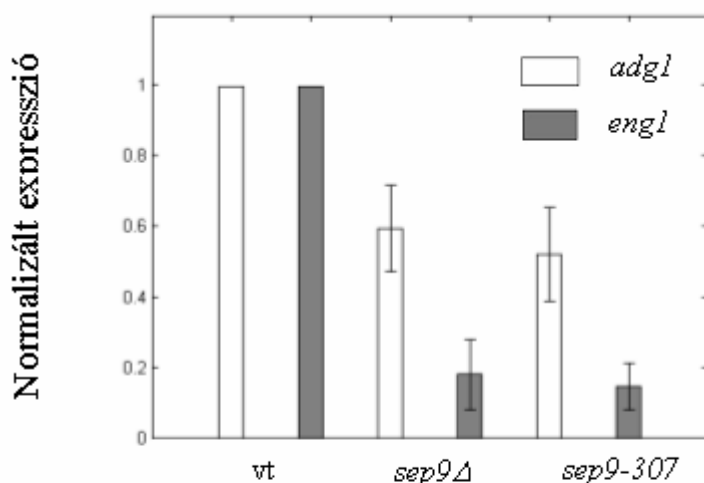
wt = 0-1 vad típusú törzs; *ace2Δ* = 2-1043 *ace2Δ*; *sep9Δ* = 2-1309 *sep9Δ*; *sep9-307* = 2-692 *sep9-307*

Annak igazolására, hogy valóban az *ace2*⁺ csökkent expressziója okozza a sejtszeparációs rendellenességeket a mutánsokban, transzformáltuk (ld. 4.5.2.7.) a 2-692 *sep9-307* törzset pREP81-*ace2*⁺ plazmiddal, mely az *ace2*⁺ gént hordozza *nmt81* tiaminnal represszálható promóterhez kapcsolva (ld. **2. táblázat**; Siam és mtsi, 2004). Kontrollként a 0-1 vad típusú és a 2-1042 *ace2Δ* törzset használtuk, utóbbinál teljes volt a komplementálás, amikor pREP81-*ace2*⁺ plazmiddal transzformáltuk és tiamint nélkülöző táptalajon növesztettük a sejteket. A transzformált 2-692 *sep9-307* sejtek tiaminmentes körülmények között („*nmt*” promóter bekapcsolva) vad fenotípust mutattak, míg tiaminban gazdag körülmények esetén („*nmt*” promóter kikapcsolva) a mutáns fenotípust mutatták (ld. **18. ábra**).



18. ábra. Az *ace2*⁺ túltermelésének hatása a sejtszeparációs zavarokra a *sep9*⁻ mutánsban. (A.) 0-1 vad típusú sejtek EMMA-n; (B.) 2-692 *sep9-307* mutáns sejtek EMMA táptalajon; (C.) pREP81-*ace2* plazmiddal transzformált 2-692 *sep9-307* mutáns sejtek EMMA táptalajon; (D.) pREP81-*ace2* plazmiddal transzformált 2-692 *sep9-307* mutáns sejtek tiaminnal kiegészített EMMA táptalajon. Méretvonal: 10 μm.

Az *adgl*⁺ és *engl*⁺ Ace2 által szabályozott gének transzkripció szintjét is megmértük a mutáns törzseinkben. 2-1309 *sep9Δ*, 2-692 *sep9-307* és 0-1 vad típusú törzsek sejtjeit „log” fázisig növesztettük komplett tápfolyadékban, majd RNS-t izoláltunk (4.5.2.3.) és cDNS-t szintetizáltunk (4.5.2.5.) *sce3RTa*, *adgl_356-375R* és *eng_1 1851-1870R* primerek (ld. **3. táblázat**) felhasználásával. Ezt követően a 4.5.2.6. fejezetben leírt paraméterek mellett kvantitatív RT-PCR reakciót hajtottunk végre a következő primerpárokkal: *sce3RTs-sce3RTa*, *adgl_356-375F-adgl_356-375R* és *eng_1 1851-1870F-eng_1 1851-1870R* (ld. **3. táblázat**). Mindkét mutáns törzsünkben mind az *engl*⁺, mind pedig az *adgl*⁺ gén csökkent expressziós szintet mutat a vad típusban lévőhöz képest (ld. **19. ábra**). Az *adgl*⁺ szintje az *ace2*⁺-vel azonos módon esett (mintegy a felére), míg az *engl*⁺ gén szintje igen jelentősen, körülbelül a vad típus ötödére csökkent.



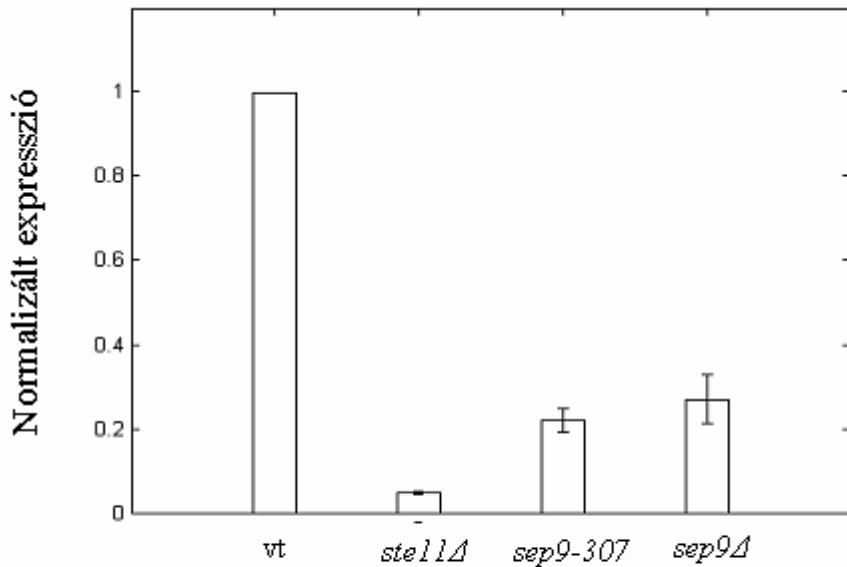
19. ábra. Az *adgl*⁺ és *engl*⁺ gének transzkripció szintjének mérése.

Jól látható, hogy a *sep9*⁻ mutánsokban az *adgl*⁺ és az *engl*⁺ gén aktivitása is jelentősen lecsökkent.

vt = 0-1 vad típusú törzs; ***sep9Δ*** = 2-1309 *sep9Δ*; ***sep9-307*** = 2-692 *sep9-307*

5.5. A *sep9*⁺ mutációjának hatása az ivari differenciálódásban szerepet játszó *aff1/stell*⁺ gén expressziójára

A *sep9*⁻ mutánsok sterilek, képtelenek még a konjugációt is végrehajtani, melynek hátterében olyan gének expressziós szintjének csökkenése állhat, amelyek a vegetatív ciklusból a szexuális ciklusba történő váltásban játszanak szerepet. Az egyik ilyen fontos szabályzó gén az *aff1/stell*⁺ (Sipiczki 1988; Sugimoto és mtsi, 1991). A jelenség feltárása érdekében megvizsgáltuk e gén transzkripció szintjét is a *sep9*⁻ mutánsainkban. A 2-1309 *sep9Δ*, 2-692 *sep9-307*, 2-1300 *aff1/stellΔ* és 0-2 homotallikus vad típusú törzseket nitrogénszegény környezetben (MSL tápfolyadék) szaporítottuk log fázisig, majd RNS-t izoláltunk a 4.5.2.3-ban leírtak alapján és sce3RTa és stell1RTright primerek (ld. 3. Táblázat) segítségével a 4.5.2.5. fejezetben ismertetett módszerrel cDNS-t szintetizáltunk. A keletkezett cDNS-t kvantitatív RT-PCR-hez (4.5.2.6. fejezet) használtuk templátként, amihez a sce3RTs-sce3RTa és a stell1RTleft-stell1RTright primerpárokat (ld. 3. táblázat) használtuk fel. A kísérletünk végeredményeként azt kaptuk, hogy az *aff1/stell*⁺ expressziós szintje körülbelül a harmadára csökkent a mutáns törzseinkben, a vad típusban tapasztalhatóhoz képest (ld. 20. ábra).

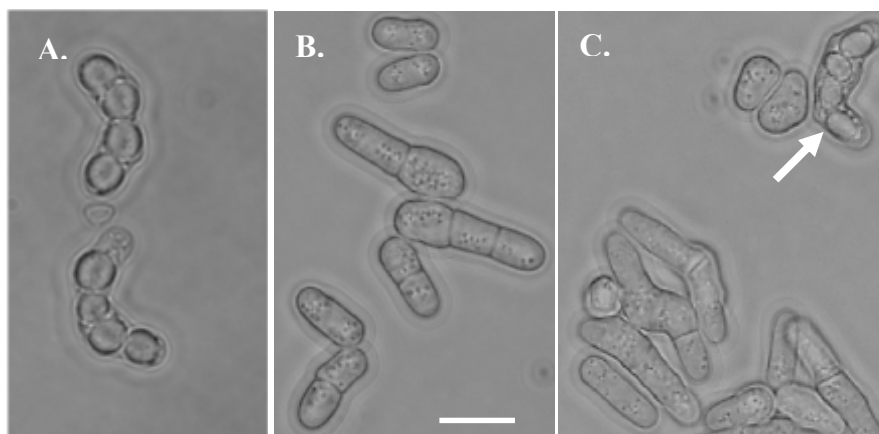


20. ábra. A *affl/stell*⁺ expressziós aktivitásának mérése. Mindkét *sep9*⁻ mutánsban jelentősen csökkent *affl/stell*⁺ expressziós szint.

vt = 0-2 L968 homotallikus törzs, ***stellΔ*** = 2-1300 *affl/stellΔ*,
sep9Δ = 2-1309 *sep9Δ*, és ***sep9-307*** = 2-692 *sep9-307*.

Megvizsgáltuk azt, hogy a teljes sterilitás hátterében valóban az *affl/stell*⁺ gén csökkent transzkripciója áll-e. Ennek érdekében a homotallikus 2-692 *sep9-307* törzs sejteit a 4.5.2.7. fejezetben leírtaknak megfelelően transzformáltuk a pSK85 plazmiddal (ld. **2. táblázat**), mely az *affl/stell*⁺ gént tartalmazza egy tiaminnal represszálható *nmt41* promóterhez kapcsolva. Kontrollként 0-2 vad típusú és 2-1300 *stellΔ* törzseket használtunk, utóbbinál teljes komplementációt tapasztaltunk miután pSK85 plazmiddal transzformáltuk a sejteket. Tiaminos közegben („*nmt*” promóter kikapcsolva) a mikroszkópos vizsgálatok során a transzformált 2-692 *sep9-307* sejtek nem mutattak ivari differenciálódásra jellemző fenotípust: konjugációt, illetve aszkuszképzést nem láttunk. Ellenben, amikor tiaminmentes tápközegben („*nmt*” promóter bekapcsolva) szaporítottuk azokat, akkor konjugáló sejteket és

aszkuszkokat is láthattunk a mikroszkópos vizsgálatok során, bár jelentősen kevesebbet, mint az a vad típusú tenyészetek esetében tapasztalható (ld. **21. ábra**).



21. ábra. Az *aff1/stell*⁺ túltermelésének hatása az ivari differenciálódás zavaraira a *sep9*⁻ mutánsban. (A.) 0-2 L968 h⁹⁰ vad típusú sejtek MSA-n; (B.) 2-692 *sep9-307* mutáns sejtek MSA táptalajon; (C.) pSK85 plazmiddal transzformált 2-692 *sep9-307* mutáns sejtek EMMA táptalajon. Nyíl jelzi a helyreálló ivari folyamatok eredményeként megjelenő aszkuszt. Méretvonal: 10 μ m.

5.6. A *sep9-307* mutáció genetikai kölcsönhatása Mediátor alegységeket kódoló „*sep*” gének mutációival

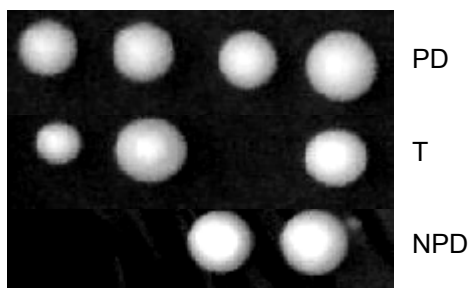
Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a *sep10/med31*⁺, *sep11/med18*⁺ és a *sep15/med8*⁺ gének Mediátor komplex alkotó alegységeket kódolnak, amely fehérjekomplex a transzkripció finomszabályozásában vesz részt (bővebben lásd a 3.7.2. fejezetet). Sikerült azt is kimutatni, hogy az olyan mutáns, amelynek *sep10/med31*⁺ génje inaktív elpusztul, amennyiben a *sep11/med18*⁺, vagy a *sep15/med8*⁺ gén is sérülést szenved, azaz a *sep10*⁻ *sep11*⁻ és a *sep10*⁻ *sep15*⁻ mutációpárok szintetikusán letálisak (Miklós és mtsi, 2008).

Kíváncsiak voltunk, hogy a feltételezett SAGA komplex alegységet kódoló *sep9*⁺ gént érintő mutáció, genetikai kölcsönhatásban áll-e az előzőekben említett Mediátor gének mutációival. Annak érdekében, hogy ezt megvizsgálhassuk kettős mutánsokat próbáltunk előállítani. Mivel mind a *sep9*⁻ mutánsok, mind a Mediátor mutánsok az ivari differenciálódásra képtelenek, ezért szomatikus sejthibridizációval (ld. 4.5.1. fejezet) diploidokat állítottunk elő a következő törzsek felhasználásával 2-692 *sep9-307* x 2-922 *sep10Δ*, 2-692 *sep9-307* x 2-896 *sep11Δ*, 2-692 *sep9-307* x 2-870 *sep15-598*. A keletkezett diploid hibridek képesek meiózison átesni és aszkuszt képezni, tekintve, hogy mindkét génből lesz ép példányuk, ami komplementációt eredményez. A diploidokat alacsony nitrogéntartalmú táptalajon (MSA) spórázni hagytuk, majd a keletkezett aszkuszokat tetrádanalízisnek vetettük alá: a spórákat mikromanipulátorral szétválasztottuk, és hagytuk azokat komplett táptalajon (YEA) telepeket képezni.

A 2-692 *sep9-307* x 2-896 *sep11Δ* és a 2-692 *sep9-307* x 2-870 *sep15-598* szomatikus hibridekből nem sikerült olyan életképes rekombinánsokat kapnunk, amelyek mindkét mutációt hordozzák. Esetükben háromféle aszkuszt kaptunk: négy, három, illetve két életképes spórát eredményező tetrádokat (ld. **22. ábra**). Amikor négy darab élő spórát sikerült izolálnunk, akkor az azokból képződött telepek sejtei valamennyien „sep” fenotípust mutattak. Ezekben rekombinációs esemény nem történt (PD tetrád). Abban az esetben, amikor mindössze két telep képződött, az azt alkotó sejtek vad fenotípusúak voltak, azaz nem hordozhatták egyik „sep” mutációt sem. A vad típusú sejtek valószínűleg egy olyan, négy kromatidát érintő rekombinációs esemény eredményei, melyek két vad típusú és két kettős mutáns meiotikus

termékhez vezetnek. Mivel a két életképes spórából vad típusú sejtekből álló telep képződött, joggal feltételezhetjük, hogy a telepet nem képző spórák voltak a kettős mutáns rekombinánsok. Ezek az NPD típusú tetradok. A három életképes spórát tartalmazó tetradok esetében egy telepnek a sejtjei vad fenotípusúak voltak, viszont két telepben a sejtek „sep” fenotípust mutattak (T típusú tetrad). Ez a kombináció úgy jöhetett létre, hogy a meiózis során itt is rekombináció történt, melynek eredménye egy életképes spóra és egy kettős mutáns spóra lett. Utóbbiból azonban telep nem képződött. Összességében elmondhatjuk tehát, hogy a *sep9*⁻ mutáció kombinálása akár a *sep11*⁻ akár a *sep15*⁻ mutációval életképtelenséghez vezet.

A 2-692 *sep9-307* x 2-922 *sep10Δ* szomatikus hibridizációjából sikerült életképes kettős mutáns törzset (2-1314) izolálni. A 2-1314 *sep9-307 sep10Δ* kettős mutáns, azonban 37°C-on nem növekedett, ellentétben a szülői típusú sejtekkel, továbbá permisszív hőmérsékleten lassabb növekedést mutatott azoknál (ld. **15. és 16. ábra**).



22. ábra. A *sep9-307* and *sep11Δ* mutációk közötti letális kölcsönhatás bemutatása. Valamennyi sor egy tetrad spóráit képviseli. (PD) 2 *sep9-307* : 2 *sep11Δ*. (T) 1 *sep9-307* : 1 vad típus : 1 elpusztult (a kettős mutáns) : 1 *sep11Δ*. (NPD) 2 elpusztult (kettős mutáns) : 2 vad típusú.

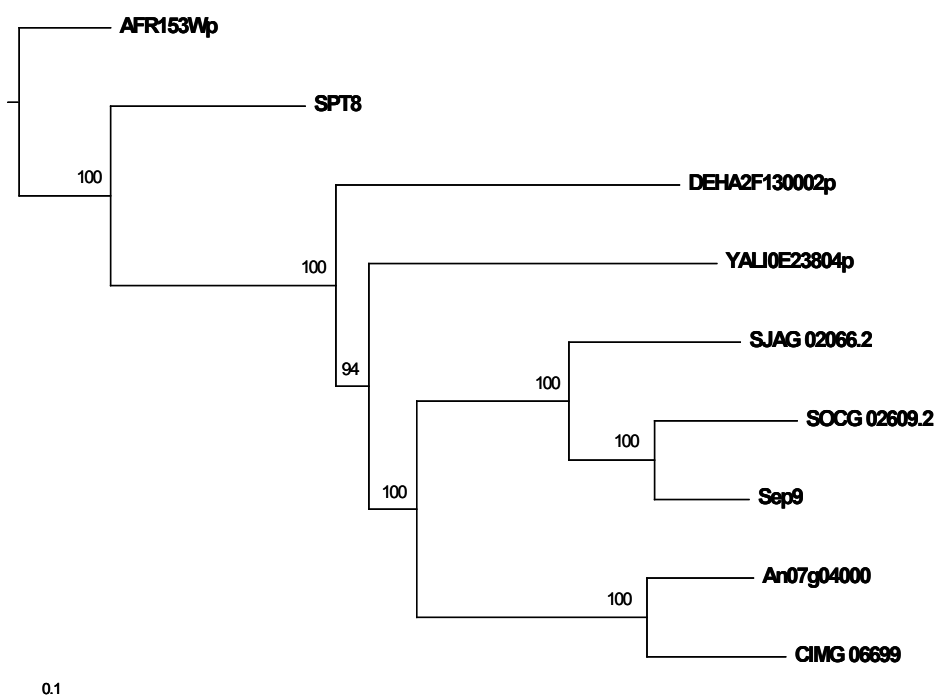
5.7. Feltételezett *sep9*⁺ ortológok azonosítása

Mivel a kromatinátrendező komplexek előfordulása általános az eukariótákban, a 4.6. fejezetben leírt bioinformatikai alkalmazások és adatbázisok segítségével Sep9 ortológokat próbáltunk keresni.

A leginkább hasonló, már kísérletesen is vizsgált és publikált fehérje a *S. cerevisiae* Spt8, mely 31%-os szekvenciaazonosságot mutatott a Sep9 fehérjével. Ám a Sep9 fehérje 76 aminosavval rövidebb az Spt8-nál, valamint e fehérjék páronkénti illesztése azt is kimutatta, hogy a megfelelő Spt8 N-terminális végi utolsó 100 aminosavánál nincs hasonlóság a Sep9-cel. Más fajokban még magasabb fokon hasonló fehérjéket találtunk: *Aspergillus niger* An07g04000, *Coccidioides immitis* CIMG_06699 és *Yarrowia lipolytica* YALI0E23804p. Azonban e fehérjéket, illetve az ezeket kódoló géneket még nem jellemezték. Nem meglepő módon a legnagyobb hasonlóságokat a *Schizosaccharomyces* csoporton belül találtuk: az SOCG_02609.2 (*Sch. octosporus*), illetve az SJAG_02066.2 (*Sch. japonicus*) hipotetikus fehérjék 73%, illetve 61% azonosságot mutattak a *Sch. pombe* Sep9 fehérjével az aminosavsorrendjükben.

Az azonosságok nem egyenletesen oszlanak el az összehasonlított fehérjék szekvenciáiban, s leginkább az N-terminális felőli végen találtunk eltéréseket. Mind az SPT8, mind a feltételezett *Schizosaccharomyces* ortológok az utolsó 74-76 pozícióban sok savas aminosavat tartalmaznak. Az aszparaginsav és glutaminsav különösen nagy mennyiségben fordul elő e szakaszokban, s az arányuk a *S. cerevisiae*-ben a legmagasabb (64%), míg a *Sch. octosporus*-ban 50%, a *Sch. pombe*-ben 47% és a *Sch. japonicus*-ban 36%. Azonban nem csak a százalékos arányban különböznek az egyes fajok, hanem a két aminosav

egymáshoz képesti arányában is. A *S. cerevisiae* fehérjében az aszparaginsav/glutaminsav hányados 32/17, azaz az aszparaginsav dominál, míg a hasadóélesztő fajokban a glutaminsavból van több: *Sch. pombe* (16/20), *Sch. octosporus* (12/26) és *Sch. japonicus* (9/18). A Fitch-Margoliash alapú családfa a filogenetikai rokonságot mutatja be a az ortológok teljes aminosav-szekvenciái között (**23. ábra**).

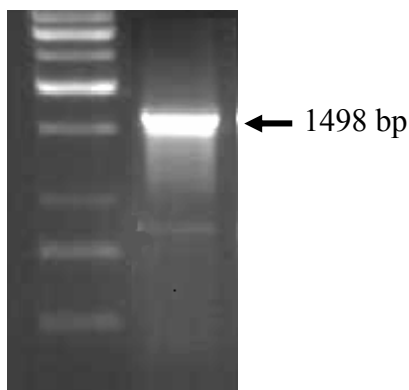


23. ábra. Különböző fajokban található Sep9 ortológok szekvenciája alapján készített családfa. Az egyes ágak a következő fajok fehérjéit jelképezik: *Ashbya gossypii* (AFR153Wp), *Aspergillus niger* (An07g04000), *Coccidioides immitis* (CIMG_06699), *Debaryomyces hansenii* (DEHA2F13002p), *S. cerevisiae* (Spt8), *Sch. japonicus* (SJAG_02066.2), *Sch. octosporus* (SOCG_02609.2), *Sch. pombe* (Sep9) és *Yarrowia lipolytica* (YALI0E23804p). Az AFR153Wp viszonyítási pont. Az ágak hosszúsága arányos az aminosavsorrendben található eltérések számával. A méretvonal a relatív ághosszúságot jelzi. “Bootstrap” értékek az elágazási pontoknál találhatóak.

5.8. A *Sch. japonicus* feltételezett *sep9*⁺ ortológjának expressziója

A *Sch. japonicus* egy olyan hasadóélesztő faj, mely képes egysejtű és többsejtés hifás növekedésre is (Sipiczki és mtsi, 1998). A hifás növekedés során a sejtek közötti válaszfalak megmaradnak, hasonlóan ahhoz, mint amelyet *Sch. pombe* a „*sep*” mutánsainál tapasztalunk, így a *sep9*⁻ esetében is. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk vajon a *Sch. japonicus*-ban található feltételezett *sep9*⁺ ortológ expressziója a *Sch. pombe sep9*⁺ génjében sérült mutánsban helyreállítja-e a normális vad fenotípust.

Annak érdekében, hogy ezt megvizsgálhassuk, *Sch. japonicus* 7-1 CCY 44-5-1 vad típusú törzs sejtjeiből genomiális DNS-t izoláltunk a 4.5.2.1. fejezetben leírtaknak megfelelően. Ezt követően a 4.5.2.4-ben ismertetett PCR reakció alkalmazásával felszaporítottuk a SJAG_02066.2-t (ld. **24. ábra**) a Sj.sep9s és Sj.sep9aBamHI primerekkel (ld. **3. táblázat**).

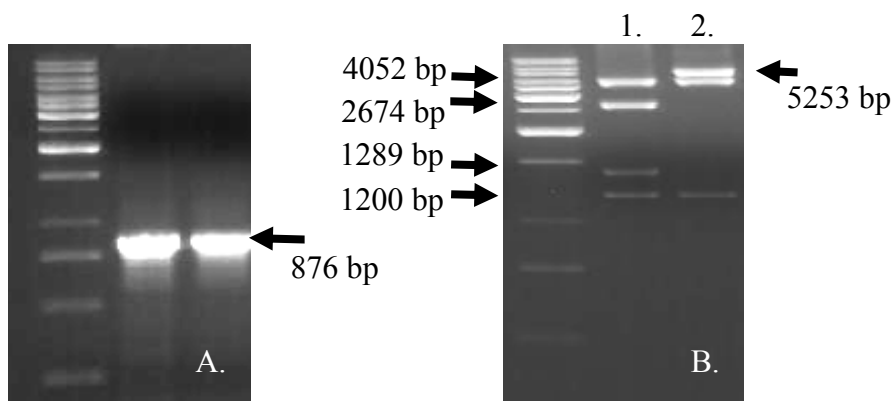


24. ábra. Az SJAG_02066.2 ORF felszaporítása. A termék 1498bp hosszúságú.

A S_j.sep9s egy *NdeI* míg a S_j.sep9aBamHI egy *BamHI* restrikciós emésztőhelyet tartalmaz. Az így keletkezett amplikont (~1,5 kb) a gyártó leírásai alapján *NdeI* (Fermentas, ER0581) és *BamHI* (Fermentas, ER0051) enzimekkel megemésztettük. A klónozáshoz szükséges pYZ1N vektort (ld. **2. táblázat** és **8. ábra**) a 4.5.2.2-ben leírtaknak megfelelően izoláltuk, majd szintén *NdeI* és *BamHI* enzimekkel emésztettük. A megemésztett SJAG_02066.2-t és pYZ1N plazmidot ligálási reakcióba vittük, a gyártó leírását betartva (T4 DNS ligáz: Promega, M1801), majd a keletkezett ligátummal a 4.5.2.7-ben ismertetett bakteriális transzformálást hajtottunk végre, melyhez az *E. coli DH5* törzsét használtuk fel.

A szelektív táptalajon kinőtt telepekből néhányat izoláltunk, melyeket a továbbiakban -70°C-on tároltunk. A kiválasztott telepekből plazmidot izoláltunk, melyeket ellenőriztünk, hogy valóban tartalmazzák-e a megfelelő pYZ1N+SJAG_02066.2 konstrukciót. Az ellenőrzés egyrészt PCR reakcióval történt (4.5.2.4.), melyben Prep41sense és S_j.sep9in primereket használtunk (ld. **3. táblázat**). E reakció során egy 876 bp nagyságú terméket kellett, hogy kapjunk. Az ennek megfelelő sávot a **25.A. ábrán** láthatjuk. A **25.B. ábrán** a pYZ1N (1.) és pYZ1NS_js9 (2.) plazmidok *EcoRI* (Fermentas, ER0271) restrikciós enzimmel készült emésztés fotóját láthatjuk. Az eredeti pYZ1N plazmid (ld. **8. ábra**) *EcoRI*-gyel történő emésztése során négy különböző DNS darabot kaptunk, melyek méretei a következők voltak: 1289 bp, 1200 bp, 4052 bp és 2674 bp, melyek jól láthatók a **25.B. ábrán**. Miután ebbe a plazmidba beépítettük az SJAG_02066.2 gént az *EcoRI* emésztési kép megváltozott. Amellett, hogy egy új DNS szakasz került beépítésre az *NdeI* és *BamHI* restrikciós hasítóhelyek közé, egy régió is kivágódott, amely egy *EcoRI*

felismerő helyet is magában foglalt. Így a pYZ1NSjs9 *EcoRI*-gyel való emésztése során az alábbi nagyságú, összesen három darab DNS darabot kaptuk: 1200 bp, 4052 bp és 5253 bp. E méreteknek megfelelő sávok szintén a **25.B.** ábrán láthatóak. Továbbá a klónozott *Sch. japonicus* feltételezett *sep9*⁺ ortológ gén szekvenciája nem mutatott eltérést az adatbázisban található szekvenciától (Batta és mtsi, 2009). Mivel a konstrukció helyes volt pYZ1NSjs9 néven bevezettük a tanszéki gyűjteményünkbe (ld. **2. táblázat**).

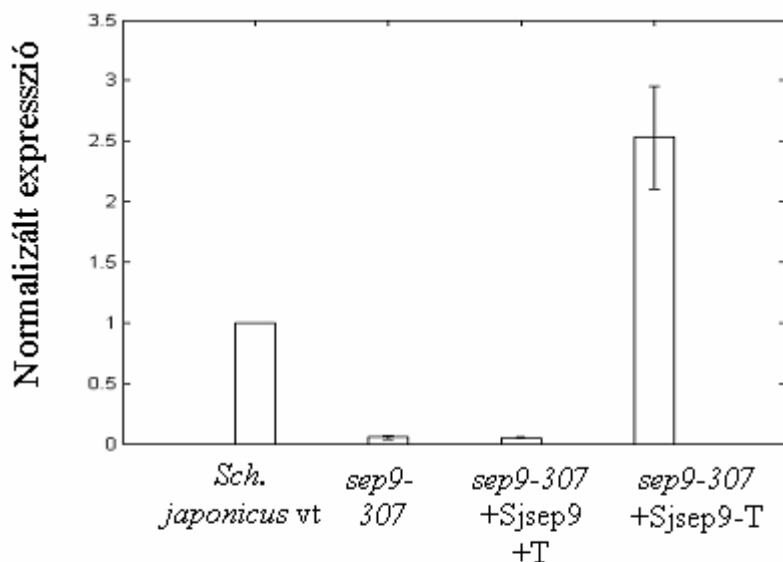


25. ábra. Az *Sch. japonicus* feltételezett *sep9*⁺ homológ génjének felszaporítása és klónozásának ellenőrzése. **(A.)** A 876 bp hosszúságú PCR termékek olyan reakciókból származnak, melyeket plazmidspecifikus, valamint a feltételezett *Sch. japonicus sep9*⁺ génjének belső szekvenciájára specifikus primerekkel amplifikáltunk. **(B.)** A pYZ1NSjs9 plazmid ellenőrzése *EcoRI* restrikciós emésztéssel: 1. pYZ1N; 2. pYZN1Sjs9.

Ezt követően a pYZ1NSjs9 plazmiddal transzformáltuk a 2-692 *sep9*-307 mutáns törzs sejtjeit, a 4.5.2.7-ben leírtaknak megfelelően. A keletkezett transzformánsok fenotípusát mikroszkóp alatt vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a komplementáció nem volt sikeres, a transzformált

sejtek továbbra is hifás képet mutattak és az ivari differenciálódás folyamata is elmaradt.

Megvizsgáltuk, hogy milyen az SJAG_02066.2 mRNS szintje a transzformáns sejtekben. Ennek érdekében RNS-t izoláltunk 7-1 *Sch. japonicus* vad típusú törzsből, a *Sch. pombe* 2-692 *sep9-307* mutánsból és a pYZ1NSjs9 expressziós vektorral transzformált 2-692 *sep9-307* mutánsból, a 4.5.2.3. fejezetben ismertetett RNS izolálási módszerrel. A sejteket tiaminban szegény környezetben növesztettük. Ezt követően cDNS-t szintetizáltunk (ld. 4.5.2.5. fejezet) sce3RTa és Sjs9RTa primerek felhasználásával (ld. 3. táblázat), végül a 4.5.2.6-ban részletezett kvantitatív RT-PCR módszerrel mérést végeztünk, melyhez a sce3RTs-sce3RTa és Sjs9RTs-Sjs9RTa primerpárokat (ld. **3. táblázat**) használtuk. A reakció kiértékelése során azt kaptuk, hogy az SJAG_02066.2 mRNS szintje kellőképpen magas (ld. **26. ábra**) ahhoz, hogy kijelentsük, hogy a komplementáció elmaradásának hátterében bizonyosan nem az SJAG_02066.2 transzkripciójának elmaradása áll.



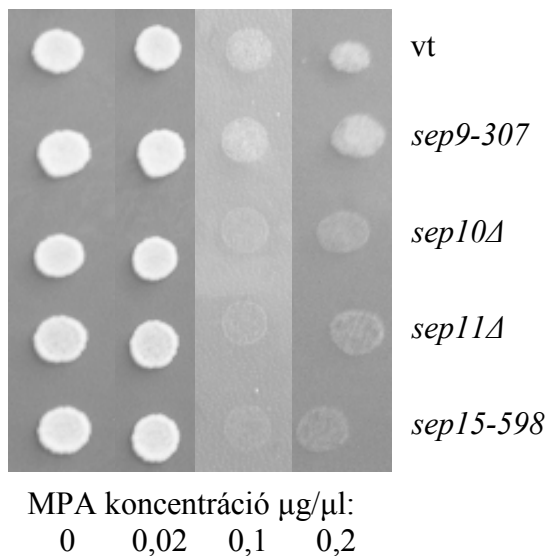
26. ábra. SJAG_02066.2 mRNS szintjének mérése.

Sch. japonicus vt=7-1 *Sch. japonicus* vad típus, *sep9-307* = 2-692 *sep9-307*, *sep9-307* + Sjsep9 + T = tiaminos táptalajon növesztett pYZ1NSjs9-cel tanszformált 2-692 *sep9-307*, *sep9-307* + Sjsep9 - T = tiaminos táptalajon növesztett pYZ1NSjs9-cel tanszformált 2-692 *sep9-307*

5.9. A *sep9*⁻ mutánsok MPA (mikofenolsav) érzékenységeinek vizsgálata

Az 4.5.3-ban leírtaknak megfelelően MPA-val szembeni érzékenységet vizsgáltunk az alábbi törzsek felhasználásával: 0-1 L972 vad típus, 2-692 *sep9-307*, 2-989 *sep10Δ*, 2-898 *sep11Δ* és 2-991 *sep15-598*. Az eredményeink során azt tapasztaltuk, hogy *sep9*⁺-ben bekövetkezett mutáció nem változtat a mikofenolsavval szembeni érzékenységen: mind a *sep9*⁻ mutáns, mind a vad típusú sejtek ugyanúgy növekednek. Ellenben, ha a Mediátor alegységeket kódoló gének inaktíválódnak, akkor megnövekszik a sejtek érzékenysége és 0,1 µg/µl

koncentrációnál már nem is tapasztalhatunk növekedést. A MPA-val szembeni érzékenységet a **27. ábra** mutatja be.



27. ábra. MPA érzékenységi teszt. Jól látható, hogy magasabb MPA koncentrációra a Mediátor alegység mutánsok érzékenyek, míg a vad típusú törzs és a *sep9* mutáns hasonlóan toleráns a méreggel szemben.

vt = 0-1 *L972*, **sep9-307** = 2-692 *sep9-307*, **sep10Δ** = 2-989 *sep10Δ*,
sep11Δ = 2-898 *sep11Δ*, **sep15-598** = 2-991 *sep15-598*

6. Eredmények megbeszélése

A korábban azonosított és jellemzett „*sep*” mutánsok számos sejtfunkciójukban sérültek, melyek közül a legfontosabbak a citokinezist és az ivari differenciálódást érintő folyamatok valamint a csökkent stresszválasz (bővebben lásd Sipiczki áttekintő cikkét, 2007). Ez az összetett fenotípus arra utal, hogy e gének termékei egy összetett hálózat részei lehetnek, melyek közvetve vehetnek részt a különböző nem létfontosságú sejtfolymatokban, azaz feltehetően valamilyen szabályozási rendszernek a tagjai (Grallert és mtsi, 1999). Az előbbiekkal összhangban közzétett eredmény, hogy a *sep1*⁺-ről sikerült kimutatni azt, hogy egy fork-head típusú transzkripció faktort kódol (Ribár és mtsi, 1997), mely többek közt az *ace2*⁺ gén átírását befolyásolja közvetlenül (Rustici és mtsi, 2004), s ezáltal szerepet játszik a sejtosztódást követő sejtszeparációban. Továbbá a *sep10*⁺, *sep11*⁺ és *sep15*⁺ gének olyan fehérjéket kódolnak, amelyekről kiderült, hogy a génátírást szabályzó Mediátor komplex alegységei (Szilágyi és mtsi, 2002; Zilahi és mtsi, 2000). A Sep10 és Sep15 fehérjék többek közt olyan gének átírásában is részt vesznek, mint koaktivátorok, melyek a sejtszeparáció utolsó lépésének résztvevői (Miklós és mtsi, 2008).

A doktori munka során a *Sch. pombe sep9*⁺ gén funkcionális analízisét végeztük el. A *sep9*⁺ gén által kódolt fehérje 31%-os szekvencia-azonosságot mutat a *S. cerevisiae* Spt8 fehérjével, mely az RNS polimeráz II alapú transzkripció szabályozásban részt vevő SAGA komplex egyik alegysége (Grant és mtsi, 1997). A SAGA komplex és a TFIID a kromatin átalakításában vesznek részt, de szerepük van a TBP (TATA kötő fehérje) promóterhez történő szállításában és a TATA-

boxhoz való kapcsolódásában is (lásd Daniel és Grant összefoglaló cikkét, 2007).

A *S. cerevisiae* Spt8 fehérjéje WD40 ismétlődő domént tartalmaz (Eisenman és mtsi, 1994). A WD40 ismétlődő szekvenciáknak nagy szerepe van a nagyméretű és összetett fehérjekomplexek kialakításában, mint például amilyen a SAGA komplex is, mivel fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tesz lehetővé a különböző alegységek között (Neer és mtsi, 1994). Másrészt az Spt8 közvetlenül felel a TBP TATA-boxhoz történő szállításáért is (Warfield és mtsi, 2004; Wu és mtsi, 2004).

Megvizsgálva a *Sch. pombe* adatbázisban található Sep9 fehérje szekvenciáját, azt találtuk, hogy a Sep9 is tartalmaz ilyen WD40 típusú ismétlődő szekvenciát, és annak ellenére funkcionálisan homológok lehetnek, hogy a *S. cerevisiae* Spt8 termeltetése *Sch. pombe sep9⁻* mutánsban nem állította vissza az eredeti vad fenotípust (Batta és mtsi, 2009). Egy másik vizsgálatunkban pedig egy még inkább hasonló (61%) feltételezett homológgal, a *Sch. japonicus*-ban található feltételezett Sep9 fehérjéjével próbáltuk komplementálni a *sep9⁻* fenotípust. Azonban itt sem tapasztaltuk azt, hogy a vad fenotípus helyreállna a *Sch. pombe sep9⁻* mutáns sejtekben történő *Sch. japonicus* feltételezett *sep9⁺* gén expressziójával. Ennek hátterében az állhat, hogy a különböző Sep9/Spt8 homológok viszonylag nagymértékű változatosságot mutatnak az igen savas N-terminális szakaszokon, mely fajra specifikus, mind az aminosavsorrendet, mind pedig a hosszt tekintve. Ezek a rendkívül változékony fehérjeszakaszok a különböző fajok sejtjein belüli, feltehetően az eltérő körülményekhez történő jobb idomulást biztosítják.

Tervbe vannak véve fordított komplementációk is, egészen pontosan a *Sch. pombe sep9⁺* gén bevitele *SPT8⁻* *S. cerevisiae*-be és az

SJAG_02066.2 gént nélkülöző *Sch. japonicus*-ba. Ez a kísérlet különösen, akkor lenne érdekes, ha a vad típus helyreállna. Továbbá nem rég vált ismertté a *Sch. octosporus* genomszekvenciája is. Figyelembe véve, hogy még nagyobb hasonlóságot mutat a benne található Sep9 ortológ a *Sch. pombe* Sep9-cel (73%), mint a *Sch. japonicus* ortológ (61%), a vele való interspecifikus komplementációt is el kell végezni a későbbiekben. E komplementációs vizsgálat esetleges sikeres volta további fontos összefüggésekre deríthet fényt.

A *S. cerevisiae* Spt8 és a *Sch. pombe* Sep9 tehát valószínűleg homológ fehérjéknek tekinthetők, amit a nagyfokú aminosavszekvencia hasonlóságból feltételezhetünk. Ezt a koncepciót tovább erősíti az a megfigyelés is, miszerint a *Sch. pombe* *sep9-307* mutáns törzs sejtjei (Grallert és mtsi, 1999), illetve e doktori munka során készített *sep9*⁺ gént teljes mértékben nélkülöző sejtek és a *S. cerevisiae* *SPT8*⁻ mutáns sejtek hasonló fenotípust mutatnak. A *sep9*⁻ mutáns sejtek a sejtszeparációban jellegzetesen sérültek, azonban a sejtenyészetek inhomogének, tehát a *sep* fenotípusú mellett, vad típusú sejtek is megfigyelhetők. Ennek okának feltárása még várat magára, de feltételzésünk szerint az *ace2*⁺ transzkripciója állhat a háttérben, aminek értéke a felére csökken, de az átírás még sem nulla szintű. Azonban az is elképzelhető, hogy bizonyos mikrokörnyezeti állapotok is befolyással vannak a vegyes tenyészetek kialakulásában, de a mi általunk használt kis térfogatok miatt ennek valószínűsége csekély. Továbbá e mutáns sejtek nagyfokú érzékenységet mutatnak a környezet által teremtett kihívásokkal szemben, mivel a stresszválasz folyamataik sérültek, illetve sterilek is, ugyanakkor a laboratóriumi szokásoknak bevett hőmérsékleten (30°C) életképesek. E jellegzetes tulajdonságok megjelennek azonban *S. cerevisiae* *SPT8*⁻

mutáns sejtek esetén is (Eisenman és mtsi, 1994). A *S. cerevisiae* SPT8 gén és az általa kódolt fehérje tehát a szokásos körülmények között nem tölt be létfontosságú szerepet a sejt működésében. Az spt8⁻ fenotípus komplexnek tekinthető, ami a SAGA függő gének megváltozott expressziójának köszönhető. E gének különböző termékei a sejtben sokrétű feladattal rendelkeznek, és nagy részük stresszindukált is (Huisinga és Pugh, 2004). Ugyanakkor ez a fenotípus nem jár végzetes következményekkel, mivel számos funkció átfedhet a TFIID-vel (Lee és mtsi, 2000; Huisinga és Pugh, 2004.) E felismerésekből és hasonlóságokból azt feltételezzük, hogy a *Sch. pombe* hasadóélesztő Sep9 fehérjéje is hasonló szerepkörrel rendelkezik a *Sch. pombe* szabályozott transzkripció folyamatában.

A *Sch. pombe* sep9⁺ cDNS szekvenciáját sikeresen meghatároztuk, majd a genomiális sep9⁺ DNS szekvenciával összevetve megállapítottuk az intron pontos helyzetét a génben. Összehasonlítva az általunk meghatározott sep9⁺ gén DNS szekvenciáját a *Sch. pombe* adatbázisban található sep9⁺ DNS szekvenciával, azt találtuk, hogy az intron helyzete eltérő a két esetben. Míg a *Sch. pombe* genomszekvenciáját tartalmazó forrás szerint az intron az 56. bázispárral kezdődik és a 102. bázispárig tart, addig a mi eredményeink azt jelzik, hogy az intron pozíciója valójában az 57. nukleotidtól kezdődik és a 103. nukleotiddal fejeződik be. Ellenben az intron méretét mi is 47 nukleotid nagyságúnak találtuk, mint ahogy az az adatbázisban is fellelhető. Ez a mindössze egy nukleotidnyi eltolódás azonban nem jelent az aminosavsorrendben semmiféle változást. Eme eredmény azt példázza, hogy a különböző algoritmusokkal számított intronhelymeghatározások pontatlanok is

lehetnek, ezért minden esetben azok kísérlettel történő bizonyítására is szükség van.

Azt is megfigyeltük, hogy a mikofenolsav (MPA) transzkripciós elongációs gátlószerral szemben nem mutatnak nagyobb érzékenységet a *sep9⁻* sejtek, mint a vad típusú sejtek. Ez az eredmény egy kissé meglepő, tekintve, hogy a *S. cerevisiae* *SPT8⁻* sejtek érzékenyek rá. Továbbá szakirodalmi adatok szerint az SPT8 fehérje, s ezáltal a SAGA komplex, nem csak a transzkripció elindításában, de az elongációban is részt vesz (Desmoucelles és mtsi, 2002; Wery és mtsi, 2004). A kérdés, hogy vajon a *Sch. pombe*-ben ezt a funkciót, mely más fehérje töltheti be, vagy egyáltalán meg van-e ez a szerepe a *Sch. pombe* SAGA komplexnek. Ennek megállapítására további vizsgálatok szükségesek.

Annak bizonyítására, hogy a Sep9 részt vesz *Sch. pombe* gének expressziójának szabályozásában, megvizsgáltuk az *ace2⁺*, *adg1⁺* és *eng1⁺*, valamint az *aff1/ste11⁺* gének transzkripciós szintjeit vad típusú és *sep9⁻* mutáns sejtekben. Mind az *ace2⁺*, mind pedig az *aff1/ste11⁺* expressziója lecsökken, ha a *sep9⁺* gént inaktiváljuk. Akárcsak az *ace2⁺*, az *aff1/ste11⁺* gén terméke is nagyon fontos központi regulátor a sejtben. Közülük az Ace2 transzkripciós faktor számos olyan génnek az átírásáért felel, mely a sejtosztódási folyamat végső eseményéhez, a sejtseparációhoz szükséges. Ilyenek például a már korábban említett *adg1⁺* és *eng1⁺* gének (lásd Sipiczki, 2007 áttekintő cikkét). A *sep9⁺* inaktivációja azonban nem csak az *ace2⁺* és az *aff1/ste11⁺* átírását csökkentette, de az *ace2⁺* függő *adg1⁺* és *eng1⁺* szintjeit is. Ez utóbbi mintegy ötszörös szintesést mutatott, szemben az *ace2⁺* és az *adg1⁺* felére csökkenésével. Ezekből az adatokból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Sep9 valóban egy transzkripciós faktor, mely szükséges az *ace2⁺*

aktiválásához, ugyanakkor a célgének átírásához közvetlenül is szükség lehet rá, mint például az *eng1*⁺ esetében. Ennek viszont részben ellentmond az a megfigyelésünk, hogy az *ace2*⁺ plazmidról történő expressziója, szinte teljes mértékben visszaállítja a vad típusú sejtekre jellemző fenotípust: a sejtek szeparációja normális, a hifás fenotípus megszűnik.

Az *Aff1/Ste11* ellenben olyan transzkripciós szabályzó molekula, mely ahhoz szükséges, hogy a sejt tápanyag hiányában a vegetatív ciklusból az ivari differenciálódás útjára lépjen (Sipiczki, 1988; Sugimoto és mtsi 1991). A külső eredetű *aff1/ste11*⁺ által megkísérelt komplementáció csak részben bizonyult sikeresnek, mivel csak a sejtek kis hányada kezdett bele a szexuális ciklusba, ami azt sugallja, hogy más *Sep9* dependens gének is léteznek az ivari differenciálódás szabályozásában. Ezek vizsgálata további kutatási feladat.

Egy korábbi tanulmányunkban kimutattuk, hogy a *sep10/med31*⁺ és *sep15/med8*⁺ gének olyan Mediátor komplex alegységeket kódolnak, amelyek az *ace2*⁺ transzkripciós regulációjában részt vesznek (Miklós és mtsi, 2008). Így az előzőekkel egybevetve kijelenthetjük, hogy mind a SAGA, mind a Mediátor komplex szükséges az *ace2*⁺ egészséges szintű átírásához. Azonban *sep9⁻ sep11⁻* és *sep9⁻ sep15⁻* kettős mutánsok életképtelensége azt mutatja, hogy az együttműködés nem korlátozódik az *aff1/ste11*⁺ vagy az *ace2*⁺ génekre, hanem más gének szabályozásában is részt vesznek közösen. Sőt, a két komplex aktivitásának együttes elrontása egyes gének transzkripciójának a minimális küszöbérték alá eséséhez vezethet, amit a sejt már nem képes elviselni: a kettős mutáns sejtek elpusztulnak. Azonban az is elképzelhető, hogy a SAGA és a Mediátor komplexek együttes elrontása összességében annyi gén

transzkripciójának zavarát idézi elő, ami már életképtelenséggel jár. Ez a megfigyelés és következtetés teljes mértékben egybevág más tanulmányok eredményeivel - korábban ugyanis azt találták más kutatók, hogy a *S. cerevisiae* SAGA és a Mediátor komplex együttműködik (Roberts és Winston, 1997; Larschan és Winston, 2005). Roberts és Winston (1997) munkája során hasonlót tapasztaltak *S. cerevisiae* élesztőben: bizonyos nem letális SAGA és Mediátor alegységek mutációinak kombinálása során a kettős mutánsok életképtelensége volt megfigyelhető. Ezen érintett gének felismeréséhez „microarray”-jel történő transzkripciós profil vizsgálatra lenne szükség a *sep9⁻* és *sep11⁻* mutánsokban is, a már elkészült *sep10⁻* és *sep15⁻* mutánsok mellett.

7. Összefoglalás

A mitotikus sejtciklus folyamatának megértése és megismerése nagy jelentőségű, különösképpen a rákos megbetegedések szempontjából. A hetvenes évektől kezdve számos új információ került felismerésre és az e téren folytatott munkásságot 2001-ben Nobel díjjal honorálták. Különösen a mitotikus ciklus két szabályozó pontját, a G1/S és a G2/M átmeneteket tárták fel részleteiben. A sejtciklus egy kevésbé tanulmányozott eseménye a citokinezis, mely az M fázis utolsó lépése és az utódsejtek ekkor válnak el egymástól.

A Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológia Tanszékén az elmúlt 15 évben intenzíven vizsgálták a citokinezis folyamatait. Modellszervezetként a *Schizosaccharomyces pombe* gombát kezdték el használni, tekintve, hogy számos tulajdonsága nagyfokú hasonlóságot mutat az emlőssejtekkel. A kilencvenes évek során, a tanszéken számos a sejtosztódásban sérült mutánst izoláltak. E mutánsok egy része a normális egysejtű állapot helyett többsejtűvé vált, mivel a sejtek osztódását követően a szeptumok hasítása elmaradt. Ezeket „sep” (szeparációs) mutánsoknak nevezték el. A genetikai analízisüket követően 16 új gén került azonosításra. Kiderült azonban az is, hogy e mutánsok nem csak a sejtciklus kivitelezésében sérültek, de egy részük a stresszválaszban, az ivari differenciálódásban és más sejtszintű folyamatokban is.

Ezek a megfigyelések felvetették annak lehetőségét, hogy az érintett gének nem közvetlenül, hanem esetleg szabályzó hálózatokon keresztül játszanak szerepet a különböző sejtfolyamatokban. Egy kézenfekvő elmélet, hogy ezek a gének transzkripciós faktorokat kódolnak és különböző gének nagyobb csoportjainak kifejeződésének szabályzásán

keresztül fejtik ki hatásaikat. Ezt az elgondolást a *sep1⁻*, *sep10⁻*, *sep11⁻* és *sep15⁻* mutánsok és a sérült gének elemzése alá is támasztotta. A *sep1⁺* gén egy fork-head típusú DNS-kötő transzkripciós faktort kódol, melynek fontos szerepe van a sejtciklus szabályozásában. A *sep10⁺*, *sep11⁺* és *sep15⁺* génekről bebizonyosodott, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* *MED31*, *MED18* és *MED8* génjeivel homológok. E gének fehérjetermékei a Mediátor komplex alegységei. A Mediátor a szabályozott génátírásban tölti be szerepét az által, hogy összeköttetést biztosít az aktivátorok, az általános transzkripciós faktorok és az RNS polimeráz II enzim között a transzkripció indításakor.

A *sep9⁺* génről szintén feltételezhető volt, hogy transzkripciós faktort kódol, amit szekvenciaelemzése is alátámaszt. A *Sch. pombe* Sep9 nagyfokú hasonlóságot mutat a *S. cerevisiae* Spt8 fehérjével, habár interspecifikus komplementációs kísérlet során az Spt8 nem komplementálta a *Sch. pombe* *sep9⁻* fenotípust. A *S. cerevisiae* Spt8 egy másik transzkripciós szabályzó komplex, a SAGA komplex alegysége. A SAGA komplex a *S. cerevisiae* gének mintegy 10%-ának aktiválásában vesz részt, melyek elsősorban stresszválaszban szerepet játszó fehérjéket kódolnak. Génaktiváló szerepét elsősorban a nukleoszómák hisztonjainak acetilálásán keresztül fejtik ki, így téve szabaddá fontos DNS szekvenciákat a transzkripciós faktorok számára, többek közt a TATA kötő fehérje (TBP) számára.

E doktori tanulmány során a *sep9⁺* gén szerepét és a *sep9⁻* mutáció okozta fenotípus molekuláris hátterét vizsgáltuk meg. Továbbá kiűtöttük a teljes gént a genomból, hogy megállapítsuk vajon létfontosságú fehérjét kódol-e. Megvizsgáltuk továbbá más „*sep*” génekkel való genetikai kölcsönhatását is, különös tekintettel a Mediátor génekre.

A két legjellemzőbb tulajdonsága a *sep9⁻* mutánsoknak, hogy rövid hifás növekedést mutatnak, illetve képtelenek a konjugációra, ami a spóráképzés elmaradásával is jár. A *sep9⁺* gén teljes eltávolítása a genomból életképes mutánsokhoz vezetett, azaz a gén nem létfontosságú. A *sep9Δ* fenotípusa majdnem teljesen megegyezik a *sep9⁻* pontmutánsával, azonban lassabban növekedik permisszív hőmérsékleten és elpusztul 37°C-on. A *Sep9⁻* mutáns sejtek a vad típushoz hasonló érzékenységet mutatnak az elongációt gátló mikofenolsavval szemben.

Annak érdekében, hogy megtaláljuk a molekuláris hátterét a *sep9⁻* fenotípusnak, transzkripciós vizsgálatokat végeztünk. Génexpressziós kísérleteink során azt találtuk, hogy mutánsainkban az *ace2⁺*, ami a citokinezis utolsó folyamatainak közvetlen szabályzó fehérjéjét kódolja, alulszabályozott. Továbbá, a vizsgált Ace2 szabályzott gének is csökkent szintet mutatnak, sőt az *eng1⁺* esetében még nagyobb mérvű esést tapasztaltunk *ace2⁺*-höz képest. Az *ace2⁺* alacsony szintje már önmagában elegendő lehet a sejtszeparációs hibákat mutató sejtek megjelenéséhez a *sep9⁻* mutánsban, de elképzelhető az is, hogy a Sep9 e targetgénnek átírására közvetlenül is hatással van. Ennek azonban ellentmond, hogy az Ace2 túltermeltetése *sep9⁻* mutáns sejtekben, majdnem tökéletesen visszaállította a vad fenotípust.

Korábbi eredmények azt mutatták, hogy a *sep10⁻* és *sep11⁻* mutánsoknál tapasztalható sérült ivari differenciálódás az *aff1/stel1⁺* gén alacsony transzkripciójának tudható be, melynek génterméke a szexuális folyamatok legfontosabb regulátora a *Sch. pombe*-ben. Megvizsgáltuk, hogy a *sep9⁻* mutáns sejtek esetében is ez-e a helyzet. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a *sep9⁻* mutációs háttérben az *aff1/stel1⁺* expressziós szintje leesik. Ugyanakkor az Aff1/Stel1 plazmidról történő termeltetése

nem állította vissza teljesen a vad fenotípust a *sep9⁻* mutánsban, ami azt jelentheti, hogy a szexuális ciklusban szerepet játszó további gének transzkripciója is érintve van.

Mivel egyes Mediátor alegységek inaktiválása is sejtszeparációs defektusokkal jár, megnéztük milyen hatással lehet a sejtre, ha a mutációkat kombináljuk. Az esetleges genetikai kölcsönhatások vizsgálatának érdekében szomatikus sejthibridizációval és azt követő rekombinációval kettős mutánsokat állítottunk elő. A tetrádanalízis elvégezve azt találtuk, hogy egyedül a *sep9⁻ sep10⁻* kettős mutáns életképes, míg sem *sep9⁻ sep11⁻* sem pedig *sep9⁻ sep15⁻* életképes kettős mutánst nem sikerült izolálni. Feltehetően a SAGA és a Mediátor komplex együttes elrontása összességében annyi gén transzkripciójának zavarát idézi elő, ami már életképtelenséggel jár.

Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a *sep9⁺* egy transzkripciós faktort kódol, melynek kulcsszerepe van a sejtszeparációs és az ivari folyamatokban. Abban az esetben, ha tönkretesszük vagy hiányzik a Sep9, számos új, a vad típustól eltérő tulajdonság jelenik meg. Azonban ezek közül egyik sem halálos hatású normális tenyésztési körülmények között. Adataink szerint Sep9 fehérje és a Sep10/Med31, Sep11/Med18 és Sep15/Med8 Mediátor alegységek egyaránt hatnak sejtszeparációs génekre. Feltételezhető, hogy további közös célgénjeik is vannak.

További kutatások szükségesek azonban, hogy még részletesebben feltárjuk a Sep9 szerepét a citokinezisben és az ivari folyamatokban, például azért, hogy további szabályzott géneket azonosítsunk valós idejű PCR és DNS chip segítségével. Az eddig nem jellemzett „*sep*” gének és az általuk kódolt fehérjék vizsgálata, illetve a már azonosított

Sep10/Med31, Sep11/Med18 és Sep15/Med8 fehérjékkel való biokémiai kölcsönhatások vizsgálata is hozzájárulhat e folyamatok szabályzó hálózatainak részletesebb megismeréséhez.

8. Summary

Understanding the process of mitotic cell division cycle is of great importance, especially due to its connection to malignant diseases. Since the 1970s much new information has been obtained about the cell cycle, and in 2001 the Nobel price was given for these achievements. Especially the two main checkpoints of the mitotic cycle (G1/S and G2/M) have been examined in details. A less studied cell cycle event is cytokinesis, the final step of the M phase, when the daughter cells become separated.

The cytokinesis has been studied intensively in the past 15 years at the Department of Genetics and Applied Microbiology, University of Debrecen. As a model organism *Sch. pombe* has been used, since it carries several features that are highly similar to mammalian cells. During the early 1990s several cytokinesis mutants have been isolated in the department. The original unicellular phenotype became multicellular since the septa between the cells were not split in these mutants. They were designated „sep” (separation) mutants. Following the genetic analyses of the mutants, 16 novel genes were identified. It was also found that some of these mutants are affected not only in the cell division cycle, but also in their sexual differentiation, stress response and other cellular events.

These observations raised the possibility that these affected genes might not directly play a role in these cell processes, but possibly through a regulatory network. An obvious theory is that these genes code for transcription factors, and these proteins affect cell mechanisms by regulating a larger proportion of genes. This idea was supported by the findings of later analyses of *sep1⁻*, *sep10⁻*, *sep11⁻* and *sep15⁻* mutants and the affected genes. *Sep1⁺* gene is coding a fork-head type DNA binding

transcription factor, that plays an important role in cell cycle events. *Sep10*⁺, *sep11*⁺ and *sep15*⁺ are homologs of *S. cerevisiae* *MED31*, *MED18* and *MED8* genes, respectively. Their protein products are subunits of the Mediator complex, which has an important role in the regulated transcription by creating a connection between activators, general transcription factors and the RNA polymerase II enzyme.

Sep9⁺ was also thought to encode a transcription factor, which is supported by the sequence similarity with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Spt8 protein indicating homology, although in an interspecific complementation analysis the expression of Spt8 did not complement the *sep9*⁻ phenotype. Spt8 is a subunit of another transcription regulating complex: SAGA complex. It plays role in the activation of about 10% of the yeast genes, mainly stress response protein coding ones. Its activation role is carried out by acetylating histones in the nucleosomes, making DNA sequences available for transcription factors, including the TATA-binding protein (TBP).

In this PhD study we analysed the role of the *Sch. pombe* *sep9*⁺ gene and the molecular basis of the *sep9*⁻ phenotype. We also tended to examine possible genetic interactions with other „*sep*” genes, especially Mediator subunit coding genes. We also generated deletion mutants, to examine whether this gene is vital for the fission yeast.

Two major characteristics of *sep9*⁻ mutants are hyphal growth and the inability to conjugate, meaning that these mutants can not produce spores. The complete deletion of *sep9*⁺ gene resulted viable mutants, which means that the gene is not essential. The *sep9Δ* mutant has almost the same phenotype as *sep9*⁻ point mutant has, but it grows slower at permissive temperature, and its cells die at 37°C in contrast to the

viability of the point mutant. *Sep9*⁻ mutant cells show the same sensitivity to transcription elongation inhibitor micophenolic acid as the wild type cells do.

We also wanted to find out what the molecular base of the *sep9*⁻ phenotype in our mutants is. In our gene expression experiments we have found that *ace2*⁺, which codes for a direct master regulator of the final step in cytokinesis, is downregulated. Ace2 targets that have also been tested showed low level of expression, moreover *eng1*⁺ was even more downregulated compared to *ace2*⁺. This *ace2*⁺ downregulation by itself might be sufficient to elicit the partial cell separation defect of the *sep9*⁻ mutant cells, but a direct involvement of Sep9 in the expression of the downstream genes is also possible. Interestingly, the overexpression of *ace2*⁺ in *sep9*⁻ strains, almost completely restored the wild type phenotype, which is contradicting the theory outlined above.

Previous results showed that the inability of sexual differentiation of *sep10*⁻ and *sep11*⁻ is due to the reduced transcription level of *aff1/stell*⁺ gene, which encodes a key regulator for sexual differentiation. We examined whether in *sep9*⁻ mutants do we have the same case. We have found out that in *sep9*⁻ mutational background the transcription level of *aff1/stell*⁺ is dropped. On the other hand the overexpression of *aff1/stell*⁺ from a plasmid did not completely restore wild type phenotype, so there must be other genes in the process of sexual differentiation that are affected.

Since the inactivation of some Mediator subunits also causes cell separation defects, we analysed the effect of the combination of mutations on the cell. To study possible genetic interactions we generated double mutants with somatic hybridisation and recombination. After the tetrad

analysis we found that only *sep9⁻ sep10⁻* double mutant was viable, but we could not obtain viable *sep9⁻ sep11⁻* or *sep9⁻ sep15⁻* double mutants. Presumably, the simultaneous impairment of the activity of the SAGA and Mediator complex affects the transcription of so many genes that the cells can not tolerate and die.

From these results we can conclude that *sep9⁺* codes for a transcription factor, which plays a key role both in cytokineses and in sexual differentiation. If the Sep9 protein is impaired or absent, then several abnormal features turn up, but none of them are lethal for the cell. According to our data the Sep9, Sep10/Med31, Sep11/Med18 and Sep15/Med8 proteins all affect cell separation genes and it is possible that they have numerous target genes in common.

Further research is necessary to explore the roles of Sep9 in the regulation of cytokinesis and sexual differentiation by identifying other target genes with the use of Real Time PCR and possibly DNA microarrays. Characterisation of the yet unidentified “*sep*” genes and studying biochemical interactions of Sep10/Med31 Sep11/Med18 and Sep15/Med8 would also contribute to a better understanding of these regulatory networks that seem to control these distinct cell processes.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Sipiczki Mátyás tanszékvezetőnek, hogy biztosította a doktori munka során elvégzett kísérletek háttérét és hasznos tanácsaival segítette és irányította munkámat. Külön köszönet illeti Dr. Szilágyi Zsoltot és Dr. Miklós Idát, akik idejüket nem kímélve segítették szakmai fejlődésemet. Továbbá köszönettel tartozom a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék valamennyi munkatársának.

Hálásan köszönöm a DE-OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetnek, hogy a Thermo ND-1000 fotométerüket használhattam nukleinsav koncentrációk mérésére.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom szüleimnek is, kitartásukért és támogatásukért.

10. Irodalomjegyzék

- Alfa C, Fantes P, Hyama J, McLeod M, Warbick E. Experiments with fission yeast: A laboratory course manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993.
- Alonso-Núñez ML, An H, Martín-Cuadrado AB, Mehta S, Petit C, Sipiczki M, del Rey F, Gould KL, de Aldana CR. Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Biol Cell 16:2003-2017, 2005.
- Amoah-Buahin E, Bone N, Armstrong J. Hyphal growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Eukaryot Cell 4:1287-1297, 2005.
- Arcangioli B, Thon G. Mating-type cassettes: structure, switching and silencing. In: The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 129-147, 2004.
- Bahler J, Steever AB, Wheatley S, Wang Y, Pringle JR, Gould KL, McCollum D. Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. J Cell Biol 143:1603-1616, 1998.
- Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast 14:943-951, 1998.
- Baker SP, Grant PA. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. Oncogene 26:5329-5340, 2007.
- Balasubramanian MK, McCollum D. Regulation of cytokinesis. In: The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 243-253, 2004.

- Batta G, Szilagyi Z, Laczik M, Sipiczki M. The involvement of the *Schizosaccharomyces pombe* sep9/spt8⁺ gene in the regulation of septum cleavage. FEMS Yeast Res 9:757-767, 2009.
- Berlin A, Paoletti A, Chang F. Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. J Cell Biol 160:1083-1092, 2003.
- Bourbon HM, Aguilera A, Ansari AZ, Asturias FJ, Berk AJ, Bjorklund S, Blackwell TK, Borggreffe T, Carey M, Carlson M, Conaway JW, Conaway RC, Emmons SW, Fondell JD, Freedman LP, Fukasawa T, Gustafsson CM, Han M, He X, Herman PK, Hinnebusch AG, Holmberg S, Holstege FC, Jaehning JA, Kim YJ, Kuras L, Leutz A, Lis JT, Meisterernest M, Naar AM, Nasmyth K, Parvin JD, Ptashne M, Reinberg D, Ronne H, Sadowski I, Sakurai H, Sipiczki M, Sternberg PW, Stillman DJ, Strich R, Struhl K, Svejstrup JQ, Tuck S, Winston F, Roeder RG, Kornberg RD. A unified nomenclature for protein subunits of Mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. Mol Cell 14:553-557, 2004.
- Buck V, Ng SS, Ruiz-Garcia AB, Papadopoulou K, Bhatti S, Samuel JM, Anderson M, Millar JB, McNerny CJ. Fkh2p and Sep1p regulate mitotic gene transcription in fission yeast. J Cell Sci 117:5623-5632, 2004.
- Bush DA, Horisberger M, Horman I, Wursch P. The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. J Gen Microbiol 81:199-206, 1974.
- Carr AM, Caspari T. Checkpoint controls halting the cell cycle. In: The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 41-56, 2004.
- Casamassimi A, Napoli C. Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. Biochimie 89:1439-1446, 2007.

- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
- Daniel JA, Grant PA. Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes. *Mutat Res* 618:135-148, 2007.
- Dekker N, Speijer D, Grün CH, van den Berg M, de Haan A, Hochstenbach F. Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell* 15:3903-3914, 2004.
- Desmoucelles C, Pinson B, Saint-Marc C, Daignan-Fornier B. Screening the yeast "disruptome" for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *J Biol Chem* 277:27036-27044, 2002.
- Ding DQ, Sakurai N, Katou Y, Itoh T, Shirahige K, Haraguchi T, Hiraoka Y. Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol* 174:499-508, 2006.
- Egel R. Fission yeast in general genetics. In: *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-10, 2004.
- Egel R, Willer M, Kjaerulff S, Davey J, Nielsen O. Assessment of pheromone production and response in fission yeast by a halo test of induced sporulation. *Yeast* 10:1347-1354, 1994.
- Eisenmann DM, Chapon C, Roberts SM, Dollard C, Winston F. The *Saccharomyces cerevisiae* *SPT8* gene encodes a very acidic protein that is functionally related to *SPT3* and TATA-binding protein. *Genetics* 137:647-657, 1994.

- Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6 (alpha2). Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA. 2001.
- Fisher D, Nurse P. Cyclins of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin Cell Biol* 6:73-78, 1995.
- García I, Jiménez D, Martín V, Durán A, Sánchez Y. The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* 97:569-576, 2005.
- Gould KL. Protein kinases driving the cell cycle. In: The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 27-36, 2004.
- Grallert A, Grallert B, Zilahi E, Szilagyi Z, Sipiczki M. Eleven novel *sep* genes of *Schizosaccharomyces pombe* required for efficient cell separation and sexual differentiation. *Yeast* 15:669-686, 1999.
- Grant PA, Duggan L, Côté J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL, Workman JL. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* 11:1640-1650, 1997.
- Gutz H, Heslot H, Leupold U, Loprieno N. *Schizosaccharomyces pombe*. In Handbook of genetics. Edited by King RC, Plenum Press, New York, pp. 395-446, 1974.
- Hadcroft AP, Proudfoot NJ. Transcription Termination. In: The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 369-379, 2004.
- Harigaya Y, Yamamoto M. Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res* 15:523-537, 2007.

- Helmlinger D, Marguerat S, Villén J, Gygi SP, Bähler J, Winston F. The *S. pombe* SAGA complex controls the switch from proliferation to sexual differentiation through the opposing roles of its subunits Gcn5 and Spt8. *Genes Dev* 22:3184-3195, 2008.
- Hughes DA. Control of signal transduction and morphogenesis by Ras. *Semin Cell Biol* 6:89-94, 1995.
- Huisinga KL, Pugh BF. A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 13:573-585, 2004.
- Humbel BM, Konomi M, Takagi T, Kamasawa N, Ishijima SA, Osumi M. *In situ* localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18:433-444, 2001.
- Johnson BF, Yoo BY, Calleja GB. Cell division in yeasts: movement of organelles associated with cell plate growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 115:358-366, 1973.
- Johnsson A, Xue-Franzén Y, Lundin M, Wright AP. Stress-specific role of fission yeast Gcn5 histone acetyltransferase in programming a subset of stress response genes. *Eukaryot Cell* 5:1337-1346, 2006.
- Katayama S, Hirata D, Arellano M, Pérez P, Toda T. Fission yeast alpha-glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J Cell Biol* 144:1173-1186, 1999.
- Keeney JB, Boeke JD. Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136:849-856, 1994.
- Kim YJ, Björklund S, Li Y, Sayre MH, Kornberg RD. A multiprotein Mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-

- terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77:559-608, 1994.
- Kimura M, Mitsuzawa H, Ishihama A. RNA Polymerases and Accessory Factors. In: *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 329-341, 2004.
- Kjaerulff S, Dooijes D, Clevers H, Nielsen O. Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S. pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *EMBO J* 1997 16:4021-4033.
- Kjaerulff S, Lautrup-Larsen I, Truelson S, Pedersen M, Nielsen O. Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals *ste11* as a mitogen-activated protein kinase target. *Mol Cell Biol* 25:2045-2059, 2005.
- Klar AJ. Regulation of fission yeast mating-type interconversion by chromosome imprinting. *Dev Suppl* 3-8,1990.
- Krapp A, Simanis V. An overview of the fission yeast septation initiation network (SIN). *Biochem Soc Trans* 36:411-415, 2008.
- Larschan E, Winston F. The *Saccharomyces cerevisiae* Srb8-Srb11 complex functions with the SAGA complex during Gal4-activated transcription. *Mol Cell Biol* 25:114-123, 2005.
- Lee KM, Miklos I, Du H, Watt S, Szilagyi Z, Saiz JE, Madabhushi R, Penkett CJ, Sipiczki M, Bähler J, Fisher RP. Impairment of the TFIIH-associated CDK-activating kinase selectively affects cell cycle-regulated gene expression in fission yeast. *Mol Biol Cell* 16:2734-2745, 2005.

- Lee TI, Causton HC, Holstege FC, Shen WC, Hannett N, Jennings EG, Winston F, Green MR, Young RA. Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* 405:701-704, 2000.
- Lindner P. *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gärungserreger. *Wochenschr Brau* 10:1298-1300, 1893.
- MacNeill SA, Nurse P. Cell cycle control in fission yeast. In: *The Molecular and Cellular Biology of Yeast Saccharomyces Vol3: Cell cycle and Cell Biology*. Edited by Pringle JR, Broach JR and Jones EW, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 697-763, 1997.
- Madison JM, Winston F. Identification and analysis of homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spt3 suggest conserved functional domains. *Yeast* 14:409-417, 1998.
- Martín-Cuadrado AB, Dueñas E, Sipiczki M, Vázquez de Aldana CR, del Rey F. The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 116:1689-1698, 2003.
- Mata J, Bähler J. Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci* 103:15517-15522, 2006.
- Maundrell K. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123:127-130, 1993
- McCollum D, Gould KL. Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends Cell Biol* 11:89-95, 2001.
- Miklos I, Szilagyi Z, Watt S, Zilahi E, Batta G, Antunovics Z, Enczi K, Bähler J, Sipiczki M. Genomic expression patterns in cell separation

- mutants of *Schizosaccharomyces pombe* defective in the genes *sep10(+)* and *sep15(+)* coding for the Mediator subunits Med31 and Med8. Mol Genet Genomics 279:225-238, 2008.
- Millar JB. Stress-activated MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) pathways of budding and fission yeasts. Biochem Soc Symp 64:49-62, 1999.
- Mitchison, M. Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. Methods in Cell Physiology, Academic Press, 131-165, 1970.
- Moreno S, Klar A, Nurse P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol 194:795-823, 1991.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. Nature 371:297-300, 1994.
- Nielsen O. Mating-type control and differentiation. In: The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 281-295, 2004.
- Ohno M, Mattaj JW. Meiosis: MeiRNA hits the spot. Curr Biol 9:66-69, 1999.
- Osterwalder A. '*Schizosaccharomyces liquefaciens* n. sp., eine gegen freie schweflige Säure widerstandsfähige Gärhefe'. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 15:5-28, 1924.
- Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12:357-358, 1996.
- Petit CS, Mehta S, Roberts RH, Gould KL. Ace2p contributes to fission yeast septin ring assembly by regulating *mid2+* expression. J Cell Sci 118:5731-5742, 2005.

- Ribar B, Banrevi A, Sipiczki M. *Sep1+* encodes a transcription-factor homologue of the HNF-3/forkhead DNA-binding-domain family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 202:1-5, 1997.
- Roberts SM, Winston F. Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/Mediator complexes. *Genetics* 147:451-465, 1997.
- Rustici G, Mata J, Kivinen K, Lió P, Penkett CJ, Burns G, Hayles J, Brazma A, Nurse P, Bähler J. Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* 36:809-817, 2004.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Shimoda C, Nakamura T. Control of late meiosis and sporulation. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 311-327, 2004.
- Siam R, Dolan WP, Forsburg SL. Choosing and using *Schizosaccharomyces* plasmids. *Methods* 33:189-198, 2004.
- Simanis V. Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. *J Cell Sci* 116:4263-4275, 2003.
- Singh G, Klar AJ. The 2.1-kb inverted repeat DNA sequences flank the mat2,3 silent region in two species of *Schizosaccharomyces* and are involved in epigenetic silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 162:591-602, 2002.
- Singh G, Klar AJ. DNA sequence of the mat2,3 region of *Schizosaccharomyces kambucha* shares high homology with the corresponding sequence from *Sz. pombe*. *Yeast* 20:1273-1278, 2003.

- Sipiczki M. The role of sterility genes (*ste* and *aff*) in the initiation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Gen Genet 213:529-534, 1988.
- Sipiczki M. Where does fission yeast sit on the tree of life? Genome Biol 1: 1011.1-1011.4, 2000.
- Sipiczki M. Splitting of the fission yeast septum. FEMS Yeast Res 7:761-770, 2007.
- Sipiczki M, Bozsik A. The use of morphomutants to investigate septum formation and cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. Arch Microbiol 174:386-392, 2000.
- Sipiczki M, Ferenczy L. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* Auxotrophic mutants of identical mating-type. Mol Gen Genet 151:77-81, 1977.
- Sipiczki M, Grallert B, Miklos I. Mycelial and syncytial growth in *Schizosaccharomyces pombe* induced by novel septation mutations. J Cell Sci 104:485-493, 1993.
- Sipiczki M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S, Miklos I. Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. Microbiology 144:1319-1330, 1998.
- Spahr H, Bève J, Larsson T, Bergström J, Karlsson KA, Gustafsson CM. Purification and characterization of RNA polymerase II holoenzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. J Biol Chem 275:1351-1356, 2000.
- Spahr H, Khorosjutina O, Baraznenok V, Linder T, Samuelson CO, Hermand D, Mäkelä TP, Holmberg S, Gustafsson CM. Mediator influences *Schizosaccharomyces pombe* RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. J Biol Chem 278:51301-51306, 2003.

- Spahr H, Samuelson CO, Baraznenok V, Ernest I, Huylebroeck D, Remacle JE, Samuelsson T, Kieselbach T, Holmberg S, Gustafsson CM. Analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Mediator reveals a set of essential subunits conserved between yeast and metazoan cells. *Proc Natl Acad Sci* 98:11985-11990, 2001.
- Su S, Yanagida M. Mitosis and cytokinesis in the fission yeast. In: *The Molecular and Cellular Biology of Yeast Saccharomyces Vol3: Cell Cycle and Cell Biology*. Edited by Pringle JR, Broach JR and Jones EW, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 765-825, 1997.
- Sugawara T, Sato M, Takagi T, Kamasaki T, Ohno N, Osumi M. In situ localization of cell wall alpha-1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microsc* 52:237-242, 2003.
- Sugimoto A, Iino Y, Maeda T, Watanabe Y, Yamamoto M. *Schizosaccharomyces pombe stell⁺* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* 5:1990-1999, 1991.
- Szilagyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M. Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. *Gene* 348:101-109, 2005.
- Szilagyi Z, Grallert A, Nemeth N, Sipiczki M. The *Schizosaccharomyces pombe* genes *sep10* and *sep11* encode putative general transcriptional regulators involved in multiple cellular processes. *Mol Genet Genomics* 268:553-562, 2002.

- Tasto JJ, Morrell JL, Gould KL. An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol* 160:1093-1103, 2003.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680, 1994.
- Warfield L, Ranish JA, Hahn S. Positive and negative functions of the SAGA complex mediated through interaction of Spt8 with TBP and the N-terminal domain of TFIIA. *Genes Dev* 18:1022-1034, 2004.
- Wery M, Shematorova E, Van Driessche B, Vandenhoute J, Thuriaux P, Van Mullem V. Members of the SAGA and Mediator complexes are partners of the transcription elongation factor TFIIS. *EMBO J* 2004 23:4232-4242.
- Witt I, Kivinen K, Käufer NF. Core Promoters in *S. pombe*: TATA and HomoID. In: *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 343-351, 2004.
- Wolfe BA, Gould KL. Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol* 15:10-18, 2005.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D,

- Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritz C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Domínguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature 415:845-848, 2002.
- Woychik NA, Hampsey M. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. Cell 108:453-463, 2002.
- Wu PY, Ruhlmann C, Winston F, Schultz P. Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. Mol Cell 15:199-208, 2004.
- Yamamoto M. Regulation of meiosis in fission yeast. Cell Struct Funct 21:431-436, 1996.
- Yamamoto M. Initiation of meiosis. In: The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Edited by Egel R, Springer-Verlag, Berlin, pp. 297-309, 2004.

- Zhao Y, Elder RT, Chen M, Cao J. Fission yeast expression vectors adapted for positive identification of gene insertion and green fluorescent protein fusion. *Biotechniques* 25:438-444, 1998.
- Zhao Y, Lieberman HB. *Schizosaccharomyces pombe*: a model for molecular studies of eukaryotic genes. *DNA Cell Biol* 14:359-371, 1995.
- Zilahi E, Miklós I, Sipiczki M. The *Schizosaccharomyces pombe sep15+* gene encodes a protein homologous to the Med8 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional Mediator complex. *Curr Genet* 38:227-232, 2000.

11. A doktori munka során megjelent publikációk

11.1. Külföldi folyóiratban megjelent és lektorált közlemények

Szilágyi Z, **Batta G**, Enczi K, Sipiczki M. Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. *Gene* 348:101-109, 2005. IF: 2,871.

Miklos I, Szilágyi Z, Watt S, Zilahi E, **Batta G**, Antunovics Z, Enczi K, Bähler J, Sipiczki M. Genomic expression patterns in cell separation mutants of *Schizosaccharomyces pombe* defective in the genes *sep10* (+) and *sep15* (+) coding for the Mediator subunits Med31 and Med8. *Mol Genet Genomics* 279:225-238, 2008. IF: 2,978.

Batta G, Szilágyi Z, Laczik M, Sipiczki M. The involvement of the *Schizosaccharomyces pombe* *sep9/spt8⁺* gene in the regulation of septum cleavage. *FEMS Yeast Res* 9:757-767, 2009. IF: 2,812.

11.2. Konferencia előadások

Batta G, Szilágyi Z, Miklós I, Sipiczki M. Mediátor gének funkcionális analízise hasadóélesztőben. "Genetikai Műhelyek Magyarországon" c. konferencia, 2005.

Batta G, Szilágyi Z, Sipiczki M. A *sep9* transzkripciósz regulátor szerepének vizsgálata hasadóélesztőben. MTA Magyar Tudomány Napja, 2006.

Batta G, Szilágyi Z, Sipiczki M. Functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *SPT8* homologue *sep9* gene in *Schizosaccharomyces pombe*. Fourth Hungarian Conference of Mycology. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 55: 176, 2008.

Batta G, Miklós I, Szilágyi Z, Sipiczki M. Általános transzkripció faktorok (a Mediátor és a SAGA komplex) szerepének genetikai elemzése a *Schizosaccharomyces pombe* sejtciklusának szabályozásában. “Genetikai Műhelyek Magyarországon” c. konferencia, 2008.

Miklós I, Szilágyi Z, Watt S, Zilahi E, **Batta G**, Antunovics Z, Enczi K, Bähler J, Sipiczki M. *Sch. pombe* Mediátor alegységek szerepe a citokinezis transzkripció szabályozásában. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus/XV. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok. Program Összefoglaló 42. oldal, 2009.

Sipiczki M, Miklós I, **Batta G**, Szászi E, Nagy R. Több szintű genetikai szabályozás a sejtciklus végén: a szeptumhasítás génjei a *Schizosaccharomyces pombe*-ben. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus/XV. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok. Program Összefoglaló 41. oldal, 2009.

11.3. Konferencia poszterek

Batta G, Szilágyi Z, Sipiczki M. Functional analysis of two novel fork-head transcription factors of fission yeast. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2003.

Miklós I, Szilágyi Z, Benkő, Z, Enczi K, **Batta G**, Sipiczki M, Bähler J. Analysis of transcriptional profiles of *S. pombe sep10* and *sep15* mutant strains, which encode subunits of the Mediator. XXIInd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Yeast 22:S152, 2005.

Batta G, Nagy R, Antunovics Z, Miklós I, Szilágyi Z, Bähler J, Sipiczki M. Transcriptional regulation by Mediator subunits in

- Schizosaccharomyces pombe*. Ann. Meeting Hung. Soc. Microbiol. Acta Microbiol Immunol Hung 53: 247, 2006.
- Sipiczki M, Miklós I, Szilágyi Z, **Batta G**. General transcription regulators (Mediator and SAGA) and fork-head transcription factors in the regulation of cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. 34th Annual Conference on Yeasts. Czechoslovak Society for Microbiology. Book of Abstracts pp. 30, 2006.
- Batta G**, Szilágyi Z, Sipiczki M. A *sep9* transzkripció faktort kódoló gén funkcionális vizsgálata hasadóélesztőben. VII. Magyar Genetikai Kongresszus/XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2007.
- Miklós I, Szilágyi Z, Watt S, Zilahi E, **Batta G**, Antunovics Z, Enczi K, Nagy R, Szászi E, Bähler J, Sipiczki, M. Transcriptional regulation in *Schizosaccharomyces pombe* cells. 15th Internat. Cong. Hung. Soc. Microbiol. Acta Microbiol Immunol Hung 54: 83-84, 2007.
- Szilágyi Z, Linder T, Miklós I, **Batta G**, Sipiczki M, Gustafsson CM. The role of the Mediator complex in the regulation of cell separation. Fourth International Fission Yeast Meeting. Book of Abstracts pp. 257, 2007.
- Batta G**, Szászi E, Nagy R, Miklós I, Sipiczki M. Cell separation genes and their transcriptional regulators in *Schizosaccharomyces pombe*. Fourth Hungarian Conference of Mycology. Acta Microbiol Immunol Hung 55:176, 2008.