



***A Schizosaccharomyces pombe sep10 és sep11 génjeinek  
klónozása és molekuláris genetikai jellemzése***

Doktori (Ph.D) értekezés

Szilágyi Zsolt

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Kar  
Debrecen, 2002





***A Schizosaccharomyces pombe sep10 és sep11 génjeinek  
klónozása és molekuláris genetikai jellemzése***

Doktori (Ph.D) értekezés

Szilágyi Zsolt

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Kar  
Debrecen, 2002





# 1. TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. TARTALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>4</b>
<b>2. BEVEZETÉS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>8</b>
3.1 A <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i> ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE .....	8
3.2 A <i>S. POMBE</i> ÉLETCIKLUSA .....	9
3.3 A <i>S. POMBE</i> SEJTCIKLUSÁNAK RÖVID JELLEMZÉSE .....	11
3.4 A <i>S. POMBE</i> CITOKINEZISÉNEK FOLYAMATA ÉS SZABÁLYOZÁSA .....	13
3.4.1 A mediális gyűrű képzése és kontrakciója .....	13
3.4.2 A szeptum képzésének iniciációja .....	16
3.4.3 A szeptum feloldása és a citokinezis befejezése .....	20
3.5 A <i>S. POMBE</i> IVARI DIFFERENCIÁLÓDÁSÁNAK ÁTTEKINTÉSE .....	21
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>25</b>
4.1 <i>S. POMBE</i> ÉS <i>ESCHERICHIA COLI</i> TÖRZSEK .....	25
<i>DH5<math>\alpha</math></i> .....	25
4.2 <i>S. POMBE</i> ÉS <i>E. COLI</i> TÁPKÖZEGEK .....	26
4.3 <i>S. POMBE</i> KLASSZIKUS GENETIKAI MÓDSZEREK .....	26
4.4 MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK .....	28
4.4.1 <i>RNS</i> izolálása, <i>Northern-blot</i> , hibridizálás és detektálás .....	30
4.4.2 <i>A S. pombe</i> sejtek transzformálása .....	30
4.4.3 <i>Plazmid stabilitási teszt</i> .....	31
4.5 SZEKVENCIÁK ANALÍZISÉHEZ HASZNÁLT BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREK .....	31
4.6 A MITOTIKUS REKOMBINÁCIÓS RÁTA KÍSÉRLETI MÉRÉSI MÓDSZERE .....	32
4.7 A SEJTEK UV ÉS NITROZOGUANIDIN ÉRZÉKENYSÉGÉNEK MÉRÉSE .....	34
4.7.1 <i>UV-érzékenység mérése</i> .....	34
4.7.2 <i>Nitrozo guanidin-érzékenység mérése</i> .....	34
4.8 MIKROSZKÓPIA .....	35
4.9 PLAZMIDOK .....	35
4.10 A PREP PLAZMIDOK FELHASZNÁLÁSA A <i>STE11</i> TÚLTERMELÉSÉRE .....	37
<b>5. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>38</b>
5.1 A <i>SEP10</i> GÉN KLÓNOZÁSA .....	38
5.1.1 <i>A sep10</i> gén klónozása genomiai könyvtárból .....	38
5.1.1 <i>Az S10-5 szubklón a sep10 gént tartalmazza</i> .....	39
5.1.2 <i>A sep10 egy intron nélküli gén és terméke egy konzervatív, feltehetően transzkripcióban szerepet játszó protein</i> .....	41
5.1.3 <i>A sep10-412 mutáns nem érzékeny mutagénekre</i> .....	44
5.1.4 <i>A sep10 mutációja nem növeli az ade6 allélok közötti mitotikus rekombináció mértékét</i> 45	
5.1.5 <i>A sep10 gén megszakítása diploid sejtben</i> .....	46
5.1.6 <i>A sep10 gén megszakítása kondicionálisan letális</i> .....	48
5.2 A <i>SEP11</i> GÉN KLÓNOZÁSA .....	50
5.2.1 <i>A sep11 gén klónozása genomiai könyvtárból</i> .....	50
5.2.2 <i>Az S11-4-es szubklón a sep11 gént tartalmazza</i> .....	51

5.2.3	<i>A sep11 gén egy 3 intront tartalmazó, homológiai nélküli proteint kódol</i> .....	53
5.2.4	<i>A sep11 gén megszakítása kondicionálisan letális</i> .....	55
5.2.5	<i>A sep10 és sep11 együttes inaktivációja letális</i> .....	57
5.3	<i>A STE11 EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA A SEP10<sup>-</sup> ÉS SEP11<sup>-</sup> MUTÁNSOKBAN</i> .....	59
5.3.1	<i>A ste11 gén transzkripciójának indukciója elmarad mindkét mutánsban</i> .....	59
5.3.2	<i>A ste11p protein túlermeltezése szupresszálja a sterilitást a sep10<sup>-</sup> azonban csak nagyon kismértékben a sep11<sup>-</sup> sejtekben</i> .....	60
<b>6.</b>	<b>EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE</b> .....	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>73</b>
<b>9.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>77</b>
<b>10.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>78</b>
<b>11.</b>	<b>A DOKTORI MUNKA SORÁN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK</b> .....	<b>86</b>





## 2. BEVEZETÉS

A sejtek az önálló biológiai rendszerek építőkövei. Legyen szó akár egy egyszerű egysejtű élőlényről, vagy bonyolult felépítésű többsejtű szervezetekről, egészen az emberig; a sejtjes szerveződés mindenhol alapvető és elengedhetetlen feltétel egy önálló biológiai rendszer fennmaradásához.

A sejtjes szerveződés a biológiai rendszer fennmaradását a sejtosztódás segítségével, azaz önmaga megduplázásának képességével teszi lehetővé. Ha ez a folyamat nem lehetséges, akkor egyéb életfolyamatok nem képesek biztosítani a biológiai rendszer hosszú távú fennmaradását. A sejtosztódás végső célja, a duplikáció alapjaiban megegyezik a két sejtípus, a prokarióta és az eukarióta sejtekben, azonban az evolúció lényegesen eltérő feladatok elvégzésének képességével ruházta fel őket, ami természetesen kihat a sejtosztódás végső célja elérésének módjára és formájára is.

Az eukarióta sejtekben a sejtosztódás folyamatát egy összetett szabályozó és végrehajtó rendszer, a sejtciklus biztosítja. Feladata a végső célhoz vezető folyamatok - a DNS állomány megkettőződése, és a megkettőzött DNS utódsejtekbe történő szétválogatása – helyes és biztonságos végrehajtása, valamint azok normális sorrendjének biztosítása. Erre a látszólag egyszerű, azonban alapvető fontosságú feladatra az eukarióta sejt a fent említett összetett rendszert tartja fenn, amelyben óvatos becslések szerint is több száz géntermék vesz részt. A géntermékeket kódoló egyes gének hibái – mutációi – a sejtciklust kisebb vagy nagyobb mértékben károsítják, ami a sejtosztódás folyamatainak károsodásához vezet. Ilyen károsodás szomorú eredménye alól az emberi sejtek sem kivételek, a hibák eredményeképpen kialakuló szabályozatlan sejtproliferáció daganatok kialakulását okozza, ami végzetes következménnyel jár.

Ezért szükségtelen hangsúlyozni, hogy a sejtosztódási folyamatokat biztosító sejtciklus megismerése és megértése a biológiai kutatások központi problematikája volt és ma is az. A megoldáshoz természetesen szükséges és valószínűleg elégséges feltétel a sejtciklusban szerepet játszó gének és géntermékek megismerése és a köztük fennálló molekuláris kapcsolatok tisztázása. Azonban - annak ellenére, hogy néhány évtizedes sejtciklus kutatás eredményeképpen számos folyamat ismertté vált – jelenleg messze nem ismerjük a sejtciklus egészét, legfeljebb vannak elképzeléseink arra vonatkozóan, hogy egyes részfolyamatok hogyan integrálódnak hozzá az egész rendszerhez. Hozzá kell tenni azonban, hogy az egyes részfolyama-

tokkal kapcsolatos további kutatások újabb szabályozási láncokat fednek fel, ami természetesen elvezethet a sejtciklus teljes megismeréséhez (Nurse, 2000).

Az elmúlt évtizedek kutatómunkája bebizonyította, hogy a sejtciklus, mint szabályozási és irányítási rendszer lényegileg az összes eukarióta sejtben hasonlóképpen működik, természetesen kisebb specialitásokkal. Ezért az egyéb biológiai jelenségek kutatásához hasonlóan, a sejtciklus kutatások során is nagy szerepet kapnak a modellszervezetek, amelyek sejtjeinek vizsgálata segítségével szerzett ismeretek felhasználhatóak a magasabbrendűek, végsősoron az emberi sejtek hasonló folyamatai megismeréséhez. A sejtciklus kutatások kedvelt és mára már megkerülhetetlen modellszervezetei az egysejtű élesztőgombák: *Saccharomyces cerevisiae* vagy sarjadzó élesztő és *Schizosaccharomyces pombe* vagy hasadó élesztő.

A *S. pombe* sejtciklus kutatások az 1970-es években kezdődtek, amikor Paul Nurse fiatal kutató izolálta első hasadó élesztő sejtciklus mutánsait és kezdte szisztematikusan vizsgálni azokat. A mutánsok genetikai, majd később a gének molekuláris biológiai és a géntermékek biokémiai vizsgálata segítségével, nagyjából negyed százados kutatómunka eredményeképpen felfedte a mitózis elindításához szükséges szabályozórendszer alapvető molekuláit és kapcsolatrendszerét, valamint megmutatta, hogy ez a rendszer teljesen analóg módon működik az emberi sejtekben is. Kutatómunkája elismeréseképpen 2001-ben megkapta az orvosi Nobel-díjat, két kollégájával megosztva, akik egyike (Leland H. Hartwell), a sarjadzó élesztő sejtciklusának kutatása során szerzett kimagasló érdemeket. Napjainkban Paul Nurse-t a hasadó élesztő sejtciklus kutatások atyjaként jegyzik, de természetesen megszámlálhatatlan laboratórium foglalkozik ma *S. pombe* sejtciklus kutatásokkal, és szerez további ismereteket a sejtosztódás folyamatairól.

Nurse és csoportja által felfedett szabályozó rendszer a G2/M átmenet szabályozása címen került be a tankönyvekbe. Ezzel nagymértékben elősegítette a sejtciklus folyamatainak megismerését. Természetesen a sejtciklus egyéb folyamatairól közel sem áll rendelkezésre ennyi ismeret, azonban folynak kutatások a sejtosztódás egyéb lépéseinek – G1/S átmenet, DNS replikáció szabályozása – megismerésére is. Így az utóbbi években került sor a sejtciklus végi események részletesebb vizsgálatára, nevezetesen a citokinezis folyamatának és szabályozásának problematikájára. A hasadó élesztő a G2/M átmenet kutatásán kívül a citokinezis kutatására is kiváló modellszervezetnek bizonyult. Számos gént és génterméket azonosítottak, amelyek valamilyen formában szerepet játszanak a citokinezis folyamatában és annak szabá-

lyozásában, azonban a citokinezis egyes lépéseinek folyamata és annak szabályozása továbbra sem ismert.

A Debreceni Egyetem Genetikai és Molekuláris Biológiai tanszékének munkatársai több éve dolgoznak a citokinezis szabályozásának és folyamatának megértésén, bekapcsolódva a nemzetközi kutatásokba. Számos *S. pombe* citokinezis mutánst írtak le, amelyeket *sep* (separation) mutánsoknak neveztek el. A *sep* család a citokinezis mutánsok új csoportját képviseli, segítségükkel lehetséges a citokinezis széleskörű szabályozásának megismerése. Ezzel összhangban a napjainkig megismert *sep1* és *sep15* gének transzkripcióban szerepet játszó regulátormolekulákat kódolnak, jelezve azt, hogy számos géntermék szabályozása szükséges a citokinezis lejátszódásához. A mutánsok citológiai és genetikai vizsgálatának eredményei is utalnak arra, hogy a géntermékek egy összefüggő szabályozási hálózat tagjai lehetnek.

A fenti előzmények alapján doktori munkám során célul tűztem ki a *sep* gének szerepének további feltárását, a *sep* géncsalád újabb tagjainak klónozásán és a gének funkcionális jellemzésén keresztül. Eredményeim alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a *sep* géntermékek egy kölcsönható szabályozási hálózat elemei lehetnek.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1 A *Schizosaccharomyces pombe* általános jellemzése

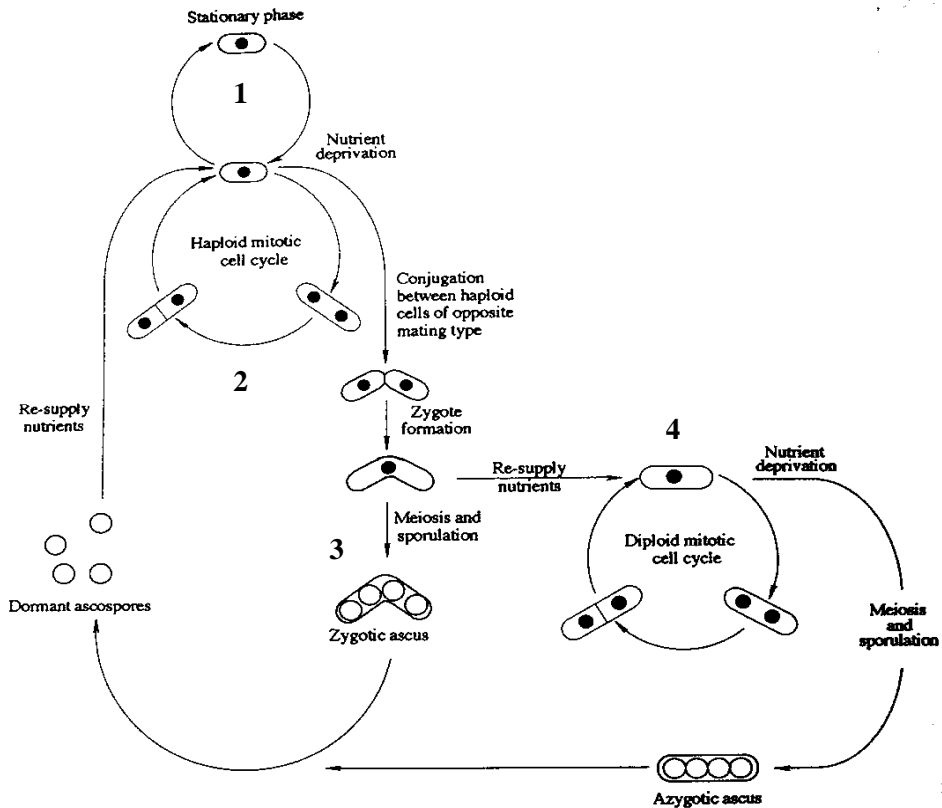
A *Schizosaccharomyces pombe* egysejtű, hasadással szaporodó élesztőgombát Lindner az észak-afrikai pombe sörből izolálta 1893-ban (Lindner, 1893). Hosszúak, szivar alakú sejtjei 7  $\mu\text{m}$  hosszúak és 3,5  $\mu\text{m}$  szélesek (1. ábra). A sejtciklus során a sejtvégeken növekednek, így osztódáskor elérik a 16 $\mu\text{m}$ -t. A mitózis végrehajtása után a citokinezis során a sejt középvonalában elhelyezett szeptum mentén kettéhasadnak (Johnson és mtsi, 1982).

A *S. pombe* a sejt szintű vizsgálatok kiváló modellszervezete. Az 1950-es években került reflektorfénybe, majd az 1970-es évektől a sejt ciklus kutatások alapvető modellszervezetévé vált, napjainkban azonban már számos kutatócsoportban egyéb biológiai folyamatok – membrántranszport, toxinok, drogok hatásmechanizmusa, stb. – vizsgálatára is felhasználják. Sejt ciklusának egyes fázisai morfológiai jegyek alapján mikroszkópiusan követhetők – például a citokinezis folyamata a szeptum elhelyezésével detektálható -, ezért az indukált mutációk sejt ciklusra illetve sejt növekedésre, avagy citokinezisre gyakorolt hatása egyszerűen detektálható. Ennek alapja, hogy életciklusára a haploid fázis túlsúlya jellemző (lásd 3.2), azaz az indukált mutációk azonnal megjelennek fenotípusában. Laboratóriumi szempontból előnyös tulajdonsága rövid generációs ideje (2-3 óra), könnyű tenyésztetősége, továbbá vizsgálatához jól kidolgozott klasszikus és molekuláris genetikai, citológiai valamint biokémiai módszerek is rendelkezésre állnak. Genomja aránylag kis méretű (13.8 Mb), az *E. coli* genomjának nagyjából 3,5-szerese, továbbá mindössze három kromoszómája van, amely előnyössé teszi a genetikai manipulációk számára. Továbbá, a több éves nemzetközi szekvenálási program eredményeképpen genomjának teljes szekvenciája rendelkezésre áll (Wood és mtsi 2002), így a *S. pombe* a hatodik eukarióta szervezet, amely genomjának teljes szekvenciája ismert.

1. ábra Vad típusú *Schizosaccharomyces pombe* sejtek differenciál kontraszt mikroszkópos felvétele. Méretvonal 5 $\mu\text{m}$ .

### 3.2 A *S. pombe* életciklusa

A *S. pombe* sejtei négy alternatív differenciálódási útvonalon haladhatnak végig életciklusuk során. Ezek a haploid vegetatív ciklus, stacioner állapot, ivari differenciálódás és diploid vegetatív ciklus, amely azonban csak laboratóriumi körülmények között létezik (2.



2.ábra A *S. pombe* életciklusa. Az egyes differenciálódási útvonalak számokkal jelölve. 1: stacioner állapot, 2: haploid vegetatív ciklus, 3: ivari differenciálódás, 4: diploid vegetatív ciklus. Forrás: MacNeill és Nurse (1997).

ábra). A folyamatokat MacNeill és Nurse 1997-ben megjelent áttekintő közleménye foglalja össze a leginkább naprakészen.

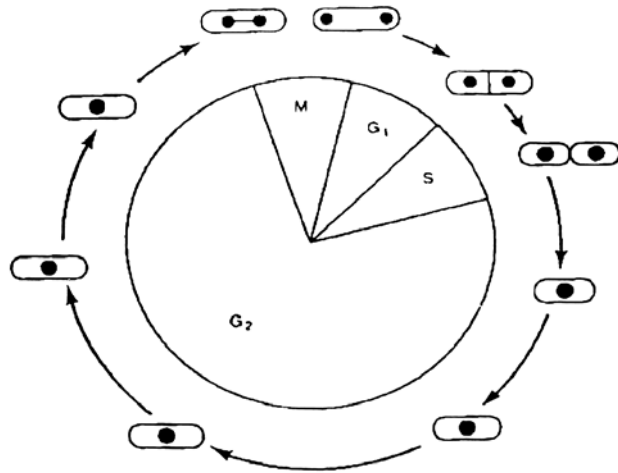
A sejtek az életciklus nagy részében a haploid vegetatív ciklus során mitózissal szaporodnak. A nitrogénforrás lecsökkenése esetén azonban két lehetséges differenciálódási útvonal végrehajtása nyílik meg. Párosodási partner hiányában a sejtek megszüntetik a mitotikus szaporodást és stacioner állapotba kerülnek, amelyből kedvező tápanyagkörülmények között a vegetatív ciklusba visszalépnek. Ellentétes párosodási partner jelenlétében a sejtek ivari

differentiálódást indítanak el. Ennek során az ellentétes párosodási típusú (lásd részletesen a 3.5 fejezetben) sejtek konjugálnak és diploid zigótát hoznak létre, amely természetes körülmények között azonnal meiózison megy keresztül, majd négy spórát tartalmazó zigotikus aszkuszt képez (2. ábra). A spórák kedvező tápanyagfeltételek között kihajtanak és belépnek a haploid vegetatív ciklusba. Laboratóriumi körülmények között létrehozható a diploid sejtek vegetatív tenyésztése is, amelyben a sejtek diploid mitózissal szaporodnak. A nitrogénforrás lecsökkenése esetén ezek a diploid sejtek meiózison mennek keresztül és négy spórát tartalmazó úgynevezett azigotikus aszkuszt hoznak létre (2. ábra). A spórák kedvező tápanyagfeltételek esetén kihajtanak és belépnek a haploid vegetatív ciklusba. A diploid vegetatív ciklusban résztvevő sejteket laboratóriumban a legtöbb esetben konjugációra nem képes sejtek fúziója (lásd 4.3) során állítják elő, a két eltérő genetikai állomány kombinálása céljából, ami szexuális úton nem lehetséges.

### 3.3 A *S. pombe* sejtciklusának rövid jellemzése

A sejtciklus szabályozásának ismert részleteiről kiváló áttekintés olvasható MacNeill és Nurse (1997) által írt könyvfejezetben, illetve újabb eredményekről Moser és Russel (2000) összefoglalójában.

Mint ahogy az eddig vizsgált eukarióta sejtek sejtciklusára, a *S. pombe* szaporodására is jellemző a DNS replikáció (S fázis), a mitózis (M fázis) valamint az ezeket összekapcsoló G1



3. ábra A *S. pombe* sejtciklusa. Láthatóak a sejtciklus egyes fázisai és a hozzájuk tartozó morfológiai és citológiai állapotok.

illetve G2 fázisok (3. ábra). A *S. pombe* sejteire jellemző a szimmetrikus osztódás, hasonlóan az emberi sejtek sejtosztódásához, a citokinezis során az osztódási szeptum az anyasejt közepén helyezkedik el, így az anya és a keletkező leánysejt mérete megegyezik. A G1 fázis ezért rövid, hiszen a keletkező leánysejt kezdeti mérete eléri a G1/S átmenethez szükséges méretet. Így G1 és az azt követő S fázis rövidek, az M fázissal együtt a sejtciklus teljes idejének mindössze egy negyedét teszik ki (lásd 3. ábra). A ciklus háromnegyed részére a hosszú G2 fázis jellemző, amely gyakorlatilag növekedési fázis, célja a mitózisba való belépéshez szükséges méret elérése (Moser és Russell, 2000). A *S. pombe* sejtek méretkontrollja tehát a G2/M átmenetnél működik. A megfelelő méret elérése után a sejtek belépnek a mitózisba, majd annak befejezése után lejátszódik a citokinezis. A rövid G1 és S fázisok, valamint az időben viszonylag hosszabb citokinezis miatt a szeptum szintézisére és annak feloldására már a következő sejtciklus G1 illetve S fázisaiban kerül sor (3. ábra).

A sejtciklus eseményeinek központi irányító molekulája a p34cdc2 protein, amely a *S. pombe*-ban megtalálható egyetlen CDK (Ciklin Dependens Kináz), amelyek funkcionális homológjai megtalálhatóak az eddig vizsgált összes eukariótában (Macneill és Nurse 1997, Moser és Russel 2000). A p34cdc2 aktivitása felel az DNS replikáció valamint a mitózis

elindításáért. Aktivitását több más protein szabályozza, ezek közé tartoznak a G1 (*pucl*, *cig1*) az S (*cig2*) és az M (*cdc13*) fázis ciklinek, amelyek periódikusan kapcsolódnak a p34cdc2 kinázhoz, és befolyásolják annak aktivitását. A mitózishoz vezető út során a p34cdc2 aktivitását a cdc13 ciklin mellett nagymértékben a wee1p kináz gátló foszforilációja, illetve a cdc25p foszfatáz serkentő defoszforilációja befolyásolja, ezzel biztosítva azt, hogy a p34cdc2 kináz aktivitása csak a G2 végére érje el a mitózis iniciálásához szükséges mértéket. Tehát az alapvető fontosságú mitotikus méret megtartásában a wee1p és cdc25p molekuláknak van szerepe. A sejtciklus helyes végrehajtásához szükséges egyéb ellenőrzési folyamatok (például a DNS replikáció helyes végrehajtása, vagy a DNS károsodások vizsgálata) is hatást fejtenek ki a p34cdc2 kináz aktivitását befolyásoló központi regulátormolekulákon (wee1p, cdc25p), ezzel biztosítva a mitózis megfelelő időben történő elindítását.



### 3.4 A *S. pombe* citokinezisének folyamata és szabályozása

A *S. pombe* citokinezisének folyamata nagyfokú hasonlóságot mutat az állati sejtek citokinezisével, azonban, révén sejtei sejtfallal rendelkeznek, hordoz a növényi sejtekre jellemző tulajdonságokat is (Field és mtsi, 1999; Feierbach és Chang, 2001) A folyamat során a mitózis lejátékozódásával párhuzamosan a sejt középvonalában egy mediális gyűrű (az irodalomban aktomiozin illetve kontraktilis gyűrű kifejezéseket is használják) képződik. A mitózis befejeződésével a gyűrű összehúzódik és a távolodó sejtmagok között lefüzi a citoplazmát. A befűzéssel párhuzamosan megindul az elsődleges szeptum szintézise, amelynek két oldalán megtörténik a másodlagos szeptumok szintézise is. A tényleges kettéosztódás az elsődleges szeptum feloldása révén történik (Johnson és mtsi, 1982; 4. ábra). A citokinesis számos folyamatának, így a mediális vagy kontraktilis gyűrű képzésének és kontrakciójának egyes részletei hasonlóképpen működnek a *Saccharomyces cerevisiae*-ben is [lásd Tolliday és mtsi (2001) összefoglalóját].

A *S. pombe* citokinezisének folyamata a fentiek alapján logikailag három fő részre bontható, ezek a mediális gyűrű képzése és annak összehúzódása, a szeptum képzése, valamint annak feloldása. Az áttekintés során ezt a logikai felosztást követve összefoglaljuk az egyes lépésekben szerepet játszó ismert fontosabb géneket, géntermékeket és azok lehetséges funkcióit, összehangolva az adott folyamat szabályozásáról és magosztódással történő összehangolásáról rendelkezésre álló ismeretekkel is, felhasználva Le Goff és mtsi (1999), Feierbach és Chang (2001), Balasubramanian és mtsi (2000) valamint McCollum és Gould (2001) összefoglalóit.

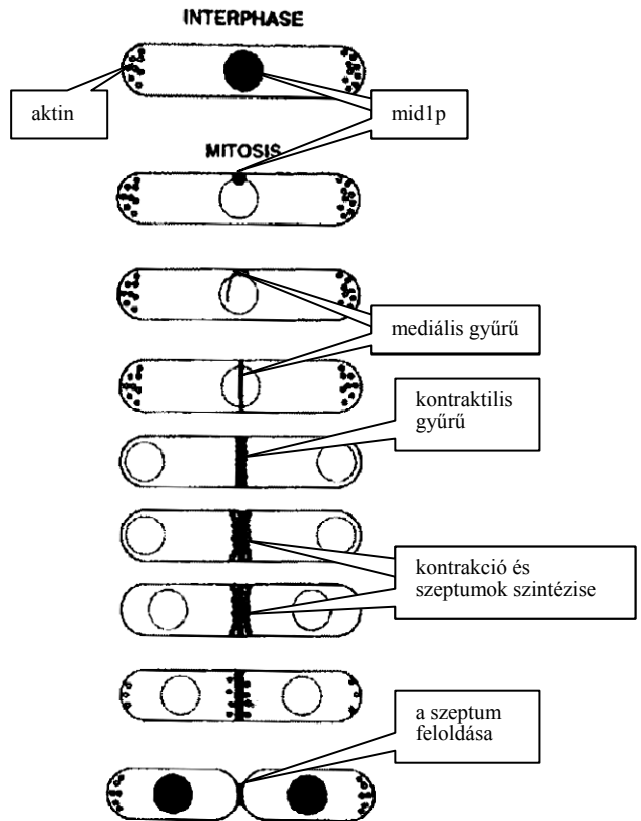
#### 3.4.1 A mediális gyűrű képzése és kontrakciója

Az utóbbi évek kutatásai eredményeképpen számos, a mediális gyűrű kialakulásában és fenntartásában szerepet játszó proteint azonosítottak [lásd Feierbach és Chang (2001), Balasubramanian és mtsi (2000) összefoglalóit]. A proteineket kódoló génekben sérült mutánsok nem képesek középvonalba elhelyezett gyűrű képzésére, következésképpen bennük a szeptumanyag abnormálisan helyezkedik el. Azonban ez nem befolyásolja lényegesen a magciklusukat, azaz több mitózison mennek keresztül citokinesis nélkül, ami több sejtmagból álló sejtek kialakulását eredményezi, amely természetesen letalitáshoz vezet [lásd Le Goff és mtsi (1999) összefoglalóját]. A kutatások eredményeképpen kialakult kép azt sugallja, hogy a mediális gyűrű bonyolult felépítésű, kontrakcióra képes protein komplexum, amely alkotó-

elemeinek pontos funkciója csak részben ismert, illetve a kontrakció mechanizmusa és szignálja ismeretlen.

A mediális gyűrű a sejt közepén elhelyezkedő korai mitotikus mag körül jelenik meg és több komponense által tehető láthatóvá (például myo2p, cdc4p, cdc12p; Feierbach és Chang, 2001 ). A gyűrű kialakulásának helye egy lényeges és máig részleteiben nem megválaszolt

kérdést vet föl, nevezetesen hogyan dönti el a sejt a gyűrű pontos pozícióját, azaz milyen mechanizmus révén biztosítja azt, hogy a gyűrű a sejt közepén helyezkedjen el? Míg az állati sejtek a mitotikus orsó egyes komponenseit használják a sejt közepének definiálására, addig a *S. pombe* sejtjei magorsó hiányában is képesek a gyűrű pontos elhelyezésére (Chang és mtsi, 1996). Az eredmények azt mutatják, hogy valószínűleg a sejt-magból származó szignálok segítik a gyűrű középre helyezését a hasadó élesztő sejtekben. Több mutáns izoláltak, amelyek nem képesek a mediális gyűrű, és következésképpen az osztódási szeptum mediális elhelyezésére (Le Goff és mtsi, 1999), azonban funkciójukról kevés információ áll rendelkezésre. A legújabb eredmények alapján elmondható, hogy a mid1p proteinnek, valamint a plo1p protein kináznak fontos szerepe van a mediális gyűrű középre történő elhelyezésében. A mid1p interfázisban a sejt-magban helyezke-



4.ábra A citokinezis folyamata *S. pombe*-ban. Interfázisban a sejtekben a mid1p a sejt-magban, az aktin a növekedő végeken található. A mitózis elindításakor a mid1p megjelenik a sejt-mag fölött. Elindul a mediális gyűrű képzése, majd kialakulása után az aktinnak a végekről a mediális gyűrű köré rendezése. A mitózis után a gyűrű összehúzódik, ezzel párhuzamosan megindul az elsődleges, és annak két oldalán a másodlagos szeptumok szintézise. Ezután a szeptum feloldásával a sejtek eloszódnak. Forrás: Le Goff és mtsi (1999).

dik el, majd korai mitózisban első proteinként jelenik meg a sejtmag fölött, a későbbi osztódási síkban. Ez a lokalizáció a sejtmag pozíciójához kötött, jelezve, hogy a mid1p protein segítségével a sejt megjelöli a sejtmag helyzetét (Paoletti és Chang, 2000). Az, hogy a sejt honnan „tudja”, hogy a mid1p-t a sejtmag fölé kell helyezni, nem ismert, azonban valószínűsítik, hogy a sejtmag fölött megjelenő mid1p számos a mid1p-vel kölcsönható proteint tartalmazhat, amelyek már interfázisban megjelölik a sejtmag pozícióját (Feierbach és Chang, 2001). A citokinezisben több funkcióval – mediális gyűrű pozicionálása, szeptum képzése - is rendelkező plo1 protein kináz a mid1p egyik lehetséges regulátora (Le Goff és mtsi, 1999). A plo1 kináz szükséges a mid1p sejtmagból történő kilépéséhez (Bahler és mtsim, 1998), valamint közvetlen kölcsönhatásba is lép vele, ezért valószínűsítik, hogy a plo1 kináz foszforilálhatja a mid1p-t, amelyet alátámaszt az is, hogy a mid1p sejtmagból történő kilépése együttjár annak foszforilációjával (Le Goff és mtsi, 1999).

Ha a sejt „eldöntötte”, hogy hova kell helyezni a mediális gyűrűt, akkor a korai mitotikus mag körül megkezdődik a mediális gyűrű összeszerelődése (Feierbach és Chang, 2001). A gyűrűbe ekkor szerveződő egyik lényeges komponens a II-es típusú myosin nehéz lánc protein, amelyet két gén is kódol, a *myo2* (Kitayama és mtsi, 1997) és a *myp2* (Bezanilla és mtsi, 1997). Mindkét géntermék szerepet játszik a citokinezisben, azonban a *myo2p* esszenciális, míg a *myp2p* bizonyos stressz körülmények között szükséges a folyamathoz (Bezanilla M és mtsi, 1997). A miozin nehéz láncok mellett identifikáltak a könnyű lánc proteineket is, a *cdc4p*-t (McCollum és mtsi, 1995) illetve *rlc1p*-t (Le Goff és mtsi, 2000). Mindkét könnyű lánc képes mindkét nehéz láncsal kölcsönhatásba lépni, azonban a citokinezishez szükséges a *cdc4p* esszenciális könnyű lánc kapcsolódása a *myo2p* nehéz lánchoz, míg az *rlc1p* regulációs könnyű láncként funkcionál, azonban pontos szerepe egyelőre ismeretlen (Feierbach és Chang, 2001). A kontrakció szempontjából lényeges myosin nehéz és könnyű lánc proteineken kívül a gyűrű felépítésében részt vesznek az *rng2p*, *rng3p* proteinek, amelyek feltehetően a myosin gyűrűbe történő összeszerelődését segítik elő (Eng és mtsi, 1998; Wong és mtsi, 2000). Továbbá a gyűrű összeszerelődéséhez szükséges a *cdc12p*, formin típusú protein is (Chang és mtsi, 1997), amelynek pontos szerepe nem ismert. A mediális gyűrű összeszerelődéséhez szükséges proteinek mellett a *cdc15p* (Fankhauser és mtsi, 1995) illetve az *imp2p* szerepet játszanak a gyűrű stabilizálásában, illetve az *imp2p*-ről valószínűsítik, hogy a gyűrű szeptációt követő szétszerelődésében lehet szerepe (Demeter és Sazer, 1998), de ennek részletei nem ismertek. Továbbá a *cdc15p*-nek szerepe lehet a szeptum szintézis elindításában is

(lásd 3.4.2). A mediális gyűrű kialakulása után a korai mitózisban megkezdődik a citokinezisben esszenciális szerepet játszó F-aktinnak a gyűrű két oldalára rendezése.

Az F-aktin a hosszú G2 fázisban történő növekedés során a sejt két végéhez koncentrálnak és feltehetően a növekedéshez szükséges membrán valamint sejtfal építésben vesz részt, majd a korai mitózisban a sejt közepére vándorol, és gyűrűszerűen körbeveszi a sejtmagot (Marks és mtsi, 1987). A legújabb eredmények szerint a kisebb nagyobb pöttyök formájában a sejtvégeken látható F-aktin mellett aktin kábelek is megfigyelhetők, amelyek behálózzák a sejtet és elősegítik az aktin struktúrák mozgását a sejten belül (Pelham és Chang, 2001), amely segítségével az aktin pöttyök célzott vándorlásra képesek az átrendeződés során.

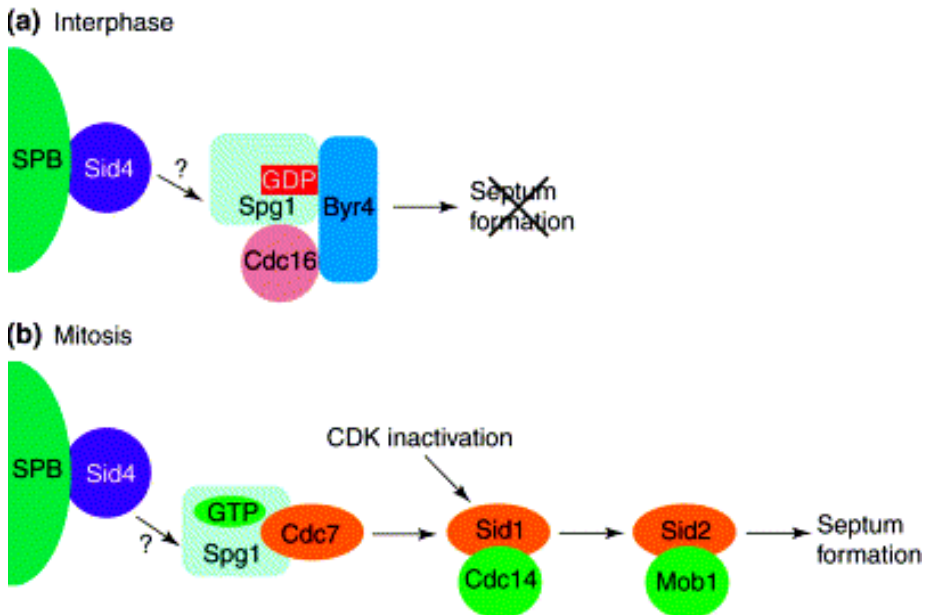
A mitózis iniciálásakor az aktin tehát a sejt középvonalába vándorol és gyűrűszerű struktúrát vesz fel, ami az anafázis kezdetén kompaktabbá válik és diszkrét gyűrűt alkot (Feierbach és Chang, 2001). Az aktin középvonalba történő rendeződéséhez szükséges számos aktinnal kölcsönható protein, mint a profilin (cdc3p, Balasubramanian és mtsi, 1994), tropomyosin (cdc8p, Balasubramanian és mtsi, 1992), arp3p (McCollum és mtsi, 1996), sop2p (Balasubramanian és mtsi, 1996), amelyek feltehetően szerepet játszanak az aktinnak a mediális gyűrű két oldalához történő rendezésében, illetve ezen keresztül a gyűrű stabilizálásában. Közvetett eredmények utalnak arra is, hogy a cdc15p protein is szerepet játszik az aktin mediális gyűrűhöz történő kapcsolódásában (Balasubramanian és mtsi, 1998), így lehetséges, hogy a cdc15p stabilizáló szerepe ennek tulajdonítható (Le Goff és mtsi, 1999). Az aktin rendeződése a mediális gyűrűhöz a korai mitózis során történik meg, majd feltehetően az anafázis során történik meg kapcsolódása a mediális gyűrű komponenseihez és ezzel az immár teljesen összeszerelődött mediális gyűrű képes kontrakcióra is. A kontrakció csak a mitózis befejeződésével, a szeptum képzésének elindításával párhuzamosan indul el (Le Goff és mtsi, 1999), amit bizonyít az a kísérletes adat, miszerint a kontraktilis gyűrű mindig a növekedő szeptum élein látható (Sipiczki és Bozsik, 2000).

#### 3.4.2 A szeptum képzésének iniciációja

A mediális gyűrű konstrikiójának és a szeptum szintézisének a magosztódással koordináltan kell megtörténnie, azaz a citoplazma lefőzése és a szeptum képzése csak a mitózis anafázisában kezdődhet el, amikor a p34cdc2 kináz aktivitás alacsony. A koordinációban szerepet játszó illetve a szeptum szintézisének iniciációjához szükséges géntermékekről az utóbbi évek kutatásai eredményei alapján egyre több információ áll rendelkezésre. A szeptáció iniciációjához szükséges géntermékekről bizonyították, hogy egy GTPáz által sza-

bályozott szignál transzdukciós kaszkád elemei, amely kaszkádot SIN-nek (Septation Initiation Network) neveztek el. Funkcionálisan hasonló szignál útvonal létezik a *Saccharomyces cerevisiae*-ben is, amelyet MEN-nek (Mitotic Exit Network) hívnak. A SIN és a MEN több funkcionálisan közös komponenst tartalmaz, azonban úgy tűnik, hogy a SIN szerepe elsősorban a szeptum képzésének elindítása, a MEN elsődleges szerepe pedig a ciklinek degradációjában, így a mitózisból történő kilépésben van. A két kaszkádról rendelkezésre álló ismeretekről McCollum és Gould (2001) összefoglalója ad áttekintést.

A SIN mai ismereteink szerinti elemeit kódoló gének a *sid4p* (Chang és Gould, 2000), *spg1p* (Schmidt és mtsi, 1997), *cdc7p* (Fankhauser és Simanis, 1994), *sid1p*, *cdc14p* (Guertin és mtsi, 2000), *sid2p* (Sparks és mtsi, 1999), *mob1p* (Salimova és mtsi, 2000), valamint a



5.ábra A szeptum képzésének iniciációja *S. pombe*-ben. Interfázisban az *spg1* GTP-ázt inaktív GDP kötött formában tartja a *cdc16-byr4* GAP komplex, így szeptum képzése nem lehetséges. Mitózisban az *spg1* aktiválódik és lehetővé válik a szeptációs kaszkádon keresztül a szeptum képzése. Részletek a szövegben. Forrás: McCollum és Gould, 2001.

*cdc16p* (Fankhauser és mtsi, 1993) és *byr4p* (Song és mtsi, 1996). Az első hét proteint kódoló géneket mint a szeptum képzéséhez szükséges géneket izolálták, amelyek mutációja során a sejtek képesek normális mediális gyűrű képzésére, azonban annak kontrakciójára és szeptum szintézisére már nem. A sejtek magciklusa azonban nem sérül, így több osztódáson mennek

keresztül citokinezis nélkül, ami természetesen letalitáshoz vezet (Le Goff és mtsi, 1999). A *cdc16p* és *byr4p* proteinek génjeinek mutációja viszont ellenőrizhetetlen szeptációhoz vezet, azaz a sejt több szeptumot is elhelyez magosztódás nélkül, jelezve, hogy a géntermékek az előző hét géntermékhez képpeszt antagonista módon hatnak (McCollum és Gould, 2001). A SIN útvonal működése az 5. ábrán látható.

A szeptum iniciációjához vezető szignálok lokalizációjának helye a centriólum, amelyet a *S. pombe*-ban SPB-nek (Spindle Pole Body) neveznek. A SIN több komponense is lokalizálódik vagy a sejtciklus teljes egészében, vagy a mitózis megfelelő fázisában az SPB-hez, ezzel feltehetően aktiválva és továbbítva szignált (McCollum és Gould, 2001). A SIN kaszkád komponenseinek lokalizációjához szükséges a *sid4p* protein, amely feltehetően kapcsolatba lép az SIN odakerülő komponenseivel, mintegy állványt biztosítva a komponenseknek, de direkt kölcsönhatás egyelőre nem bizonyított (McCollum és Gould, 2001; 5. ábra). A SIN kaszkád aktiválásában a több funkcióval (például mediális gyűrű pozicionálása, lásd 3.4.2) rendelkező *plp1* kináznak is lehet szerepe. A *plp1* szintén az SPB-hez lokalizált a sejtciklus alatt, és eredmények utalnak arra, hogy több SIN komponens lehet a kináz szubsztrátja (McCollum és Gould, 2001)

A SIN központi pozitív regulátora a Ras szupercsaládba tartozó *spg1p* GTPáz, amely az SPB-n helyezkedik el a sejtciklus során és interfázisban GDP kötött inaktív formában van. Az aktiválást, azaz a GDP-GTP átalakulást megakadályozza a *cdc16p* és *byr4p* GAP (GTPase Activating Protein) proteinekből álló komplexnek az *spg1p*-hez való kapcsolódása (Furge és mtsi, 1998) (5. ábra). A metafázis során, amikor a magorsó kezd kialakulni, az *spg1p* GTP kötött formában aktiválódik. Az aktiváció pontos mechanizmusa nem ismert, de valószínűleg a *cdc16p*-*byr4p* komplex inaktiválásával történik (lásd lentebb). Az mindenesetre bizonyos, hogy az *spg1p* megfelelő időben történő aktiválása a mitózis-citokinezis koordináció egyik kulcsfontosságú lépése.

A GTP kötött *spg1p* elindítja a kaszkád tagjainak SPB-re kerülését. A *cdc7p* kináz képes az *spg1p*-GTP- hez kötődni, és feltehetően a kötődés hatására aktiválódik, azaz „találja meg” szubsztrátjait (McCollum és Gould, 2001). Amikor a magorsó által a kromoszómák szeparálódnak az anafázis B-ben, a *sid1p* és *cdc14p*-ből álló komplex arra az SPB-re lokalizálódik, mely tartalmazza az *spg1p*-GTP-*cdc7p* komplexet (továbbiakban aktivált SPB), és feltehetően továbbítja a szignált. A *sid1p*-*cdc14p* komplex aktivált SPB-re kerülésének feltétele a *p34cdc2* kináz aktivitásának leesése, ami mutatja, hogy a kaszkád további aktiválásához be

kell fejezni a mitózist (Guertin és mtsi, 2000). Az, hogy a p34cdc2 inaktivációt milyen módon érzékeli a SIN, nem ismert (5. ábra).

A sid1p-cdc14p kináz komplex SPB-re kerülése lehetővé teszi a sid2p-mob1p kináz komplexnek, - amely már interfázisban is az SPB-n helyezkedik el – a mediális gyűrűre történő lokalizációját (a mob1p-sid2p a gyűrűn kívül továbbra is megfigyelhetők az aktivált SPB-n). Ez a lokalizáció áttevődés feltehetően bizonyos, egyelőre ismeretlen target proteinek foszforilációját eredményezi, amelynek következménye a mediális gyűrű összehúzódása és a szeptum szintézise (Sparks és mtsi, 1999). A sid2p-mob1p mediális gyűrűre kerülésének mechanizmusa ismeretlen, de eredmények utalnak arra, hogy az anafázis után az SPB citoplazmatikus oldalán megjelenő mikrotubulusok játszanak szerepet a komplex gyűrűre történő transzportjában (Sparks és mtsi, 1999). Az 1,3  $\beta$ -glukánból álló elsődleges szeptum szintéziséért a cps1p  $\beta$ -glukán szintáz felelős (Liu és mtsi, 1999), amely a legújabb eredmények szerint a mediális gyűrű helyére lokalizálódik az anafázis után, az összehúzódó gyűrű mentén végzi a szeptum szintézisét (Liu és mtsi, 2002).

A kontrakció és a szeptum képzésének magosztódással való összehangolásáról kevés ismeret áll rendelkezésre. Annyi bizonyosnak látszik, hogy a mitózis befejezése, azaz a p34cdc2 kináz aktivitásának leesése szükséges a SIN feladatának elvégzéséhez (lásd fentebb, illetve McCollum és Gould, 2001). Eredmények utalnak arra is, hogy az spg1 inaktiválását, majd megfelelő időben történő aktiválását végző cdc16p-byr4p GAP komplex (lásd fentebb) szabályozásán keresztül a mitotikus apparátus ellenőrzi a SIN működését, ugyanis a *cdc16* inaktiválása metafázisban lehetővé teszi az akkor még magas p34cdc2 kináz aktivitásának leesését, vagyis a szeptáció elindítását (Fankhauser és mtsi, 1993). Azonban az a mechanizmus, ahogy a mitotikus apparátus befolyásolja a GAP aktivitását, így a metafázis-anafázis átmenet ellenőrzéséig fenntartva annak gátló hatását nem engedi a szeptációt elindítását, majd anafázisban lehetővé teszi egyelőre ismeretlen. Feltételezik, hogy a metafázis anafázis átmenet ellenőrzését végző magorsó ellenőrzési pontban szerepet játszó Zfs1p és Dma1p géntermékeknek lehet hatásuk a cdc16p-byr4p szabályozására (McCollum és Gould, 2001).

Eredmények utalnak arra is, hogy nemcsak a mitózis befejezése befolyásolja a citokinezis lejátsszódásának időzítését, hanem a citokinezis helyes lejátsszódása is kihatással van a magciklusra. A feltételezett mechanizmusra kísérletes adatokat a citokinezisben szerepet játszó *sepl* (lásd még 3.4.3) és a mitózis iniciálásában szerepet játszó *wee1*, *cdc2*, *cdc25* gének közötti genetikai kölcsönhatások vizsgálata adott (Grallert és mtsi, 1998). Ezek alapján felté-

teleznek egy olyan mechanizmust, miszerint a mitózis iniciálása előtt a sejt ellenőrzi a citokinezis helyes végrehajtásához szükséges eseményeket, és befolyásolja a mitózis elkezdését, ha a citokinezis folyamata valamilyen oknál fogva nem játszódhat le helyesen (Grallert és mtsi, 1998). A fenti mechanizmusra utaló adatokat a *cps1p*  $\beta$ -glukán szintáz (lásd fentebb) génjében mutáns sejtek vizsgálata is adott (Liu és mtsi, 2000). A sejtekben megtörténik a mediális gyűrű szintézise, azonban lévén a *cps1p* szükséges az elsődleges szeptum szintéziséhez, annak elhelyezése elmarad. Azonban a sejtek a SIN mutánsoktól eltérően nem lépnek következő magciklusokba, hanem két sejttaggal és stabil mediális gyűrűvel blokkolt állapotban lizálnak (Liu és mtsi, 2000). A fenotípus azt jelzi, hogy a mutánsokban a feltételezett mechanizmus aktív és megakadályozza további mitózisok lejátszódását, a citokinezis végrehajtásának elmaradása miatt. Az eredmények azt mutatják, hogy az ellenőrzőpont működéséhez szükséges a mediális gyűrű megléte illetve a SIN megfelelő működése. Továbbá a mitózis iniciációjában szerepet játszó *wee1p* protein kináz is szerepet játszik benne, ami jelzi a *sep1* gén igénylő fentebb említett mechanizmussal való hasonlóságot. A feltételezett mechanizmus folyamatáról és a benne szerepet játszó géntermékekről részletek egyelőre nem ismertek.

#### 3.4.3 A szeptum feloldása és a citokinezis befejezése

Ellentétben a mediális gyűrű képzésének és a szeptum szintézisének folyamatairól rendelkezésre álló ismeretekkel, a szeptum feloldásának folyamatáról és szabályozásáról kevés ismeret áll rendelkezésre. Az irodalomban leírtak több mutánst, amelyekben megtörténik a szeptum helyes szintézise, de annak feloldása elmarad (Le Goff és mtsi, 1999). A szeparációs mutánsok legnagyobb csoportját a *sep* (separation) mutánsok képezik (Sipiczki és mtsi, 1993, 1999; Grallert és mtsi, 1997, 1999). Az elsőként leírt szeptum feloldásához szükséges gén, a *sep1*, egy fork-head típusú transzkripció faktor kódol (Ribár és mtsi, 1997), ami jelzi, hogy a szeptum feloldásához számos gén aktiválása szükséges. Ez az elképzelés összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy cikloheximid hatására a *S. pombe* sejtekben lejátszódik a szeptum képzése, de annak feloldása elmarad (Le Goff és mtsi, 1999).

A *sep1* gén mutációja befolyásolja a mediális gyűrű képzéséhez szükséges *cdc15* gén transzkripcióját (Zilahi és mtsi, 2000A), azonban a *sep1* mutációja nem okoz defektusokat sem a mediális gyűrű képzésében sem a szeptációban, jelezve, hogy a *sep1p*-nek a *cdc15*-re gyakorolt hatása csak a *sep1p* másodlagos funkciója lehet, és feltehetőleg több folyamatra is hatással van. Alátámasztja ezt az elképzelést a *sep1* génnek a mitózis iniciálásában szerepet



játszó *wee1*, *cdc2* és *cdc25* génekkel mutatott genetikai kölcsönhatása is (Grallert és mtsi, 1998), ami az sugallja, hogy a *sep1p* génterméknek a mitózis és a citokinezis folyamatainak összehangolásában is lehet szerepe (lásd 3.4.2). A szeptum feloldásában szerepet játszó egyéb *sep* gének mutációi is több sejtfolymatra vannak hatással (Grallert és mtsi, 1999), ami jelzi, hogy a szerepük a szeptum feloldásában nem közvetlen, sokkal inkább annak feloldásához szükséges szignálok továbbításában lehet szerepük. Az ebbe a csoportba tartozó *sep15* gén vizsgálata is alátámasztja ezt, hiszen a *sep15* a *sep1*-hez hasonlóan egy transzkripcióban szerepet játszó regulátort kódol és feltehetően a szeptum feloldásában szerepet játszó gének megfelelő aktiválásában lehet feladata (Zilahi és mtsi, 2000b). Újabb eredmények utalnak arra, hogy a szeptum feloldásához nem feltétlenül szükséges az elsődleges szeptum enzimátikus feloldása, lehetséges, hogy csak a szeptumot határoló sejtfalanyag irányított enzimátikus feloldása is elegendő a szeparációhoz (Sipiczki és Bozsik, 2000). A feloldáshoz vezető szignál természete azonban továbbra is ismeretlen.

A legújabb eredmények szerint az exocitózisban szerepet játszó *sec8p*, *sec6p*, *sec10p*, *exo70p* proteinek génjeinek mutációi is sejtseparációs defektusokhoz vezetnek, jelezve, hogy a polarizált növekedéshez illetve az osztódási szeptum szintéziséhez kevésbé, míg a szeptum feloldásához számos enzim időben és térben irányított működésére van szükség (Wang és mtsi, 2002).

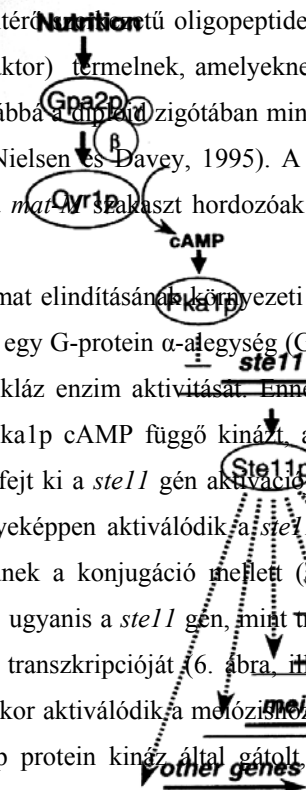
### 3.5 A *S. pombe* ivari differenciálódásának áttekintése

A *sep10* és *sep11* gének mutációi a citokinezis folyamatán kívül érintik az ivari differenciálódást is (Grallert és mtsi, 1999), ezért röviden áttekintjük a *S. pombe* ivari folyamatainak témához kapcsolódó részeit, felhasználva Nielsen és Davey (1995), valamint Yamamoto és mtsi (1996, 1997) összefoglaló munkáit.

Az ivari differenciálódás során a *S. pombe* ellentétes párosodási típusú sejtjei ( $h^+$  és  $h^-$ ) konjugálnak, majd a diploid zigóta meiózison megy át és négy spórát képez (Nielsen és

Davey, 1995). A *S. pombe* tenyészetek párosodási szempontból lehetnek homotallikusak ( $h^{90}$ ) és heterotallikusok ( $h^+$  és  $h^-$ ). A homotallikus tenyészet sejtjei képesek egymást között végrehajtani a szexuális szaporodást, míg a heterotallikus tenyészet sejtjei csak ellentétes párosodási típusú sejtekkel képesek ivari differenciálódásra. Azt, hogy egy *S. pombe* sejt milyen párosodási típusú, a *mat1* lókuszt határozza meg, amely két alternatív DNS szakaszt tartalmazhat. Ha a *mat1-P* szakaszt tartalmazza, akkor a sejt  $h^+$ , ha *mat1-M* szakaszt akkor  $h^-$  párosodási típusú. A *mat1-P* szakasz magába foglalja a *mat1-Pc* és *mat1-Pm* géneket, míg a *mat1-M* a *mat1-Mc* illetve *mat1-Mm* géneket. A P illetve M információ a *mat2* illetve *mat3* lókuszekben van tárolva, de ezek nem fejeződnek ki. A homotallikus ( $h^{90}$ ) törzs sejtjei képesek arra, hogy *mat2* vagy *mat3*-ban tárolt információt az aktív *mat1* lókuszbba juttassák (homológ rekombinációval) és így párosodási típust váltsanak átlagosan három generációnként (Nielsen és Davey, 1995). Így a homotallikus törzs tenyésze ellentétes párosodási típusú sejtek keverékéből áll, ami lehetővé teszi a differenciálódási folyamat lejátszódását egy tenyészetben belül is. Az egyes párosodási típusú sejtek eltérő típusú oligopeptideket, úgynevezett párosodási feromonokat (M-faktor illetve P-faktor) termelnek, amelyeknek fontos szerepük van a szexuális folyamatok elindításában, továbbá a konjugációban mindkét párosodási feromon szükséges a meiózis iniciálásához is (Nielsen és Davey, 1995). A *mat-P* szakaszt hordozó sejtek (P-sejtek) termelik a P-faktort, a *mat-M* szakaszt hordozóak (M-sejtek) pedig az M-faktort.

Az ivari differenciálódási folyamat elindításának környezeti szignálja a nitrogén forrás lecsökkenése (N-éhezés). A szignált egy G-protein  $\alpha$ -alegység (Gpa2p) ismeretlen módon érzékeli, és gátolja a Cyr1p adenilát-cikláz enzim aktivitását. Ennek hatására a sejtben lecsökken a cAMP szint. Ez gátolja a Pka1p cAMP függő kinázt, ami vegetatív növekedés során ismeretlen módon negatív hatást fejt ki a *ste11* gén aktivációjára (Yamamoto és mtsi, 1997). Hatásának csökkenése eredményeképpen aktiválódik a *ste11* gén. Ezzel a vegetatív növekedés helyett a sejtek elköteleződnek a konjugáció mellett (a meiózis iniciációjához egyéb feltételeknek is teljesülnie kell) ugyanis a *ste11* gén, mint transzkripció faktor aktiválja differenciálódás specifikus gének transzkripcióját (6. ábra, illetve Yamamoto és mtsi 1997). Így a *ste11p* protein által már ekkor aktiválódik a meiózis szükséges *mei2* gén, de ekkor még a negatív szabályozó *pat1p* protein kináz által gátolt, nem képes feladatának ellátására (Yamamoto és mtsi, 1997). Emellett a *ste11* transzkripció faktor P sejtekben beindítja a párosodási típust meghatározó *mat1-Pc* illetve M sejtekben *mat1-Mc* gének átírását (6.



6. ábra A *ste11* gén szerepe a *S. pombe* ivari differenciálódása során. Látható, hogy a cAMP szint lecsökkenése közvetve elindítja a *ste11* gén aktivációját, ami lehetővé teszi az ivari folyamatok elindítását, számos gén aktivációján keresztül. Forrás: Yamamoto és mtsi, 1997.

ábra), amelyek termékei ugyancsak transzkripciós faktorok és indukálják a párosodási feromonok génjeit. Ennek következtében párosodási feromonok (P-faktor és M-faktor) termelése indul meg. Emellett indukálódnak a feromon receptorok génjei is, a P-sejtek M-faktor receptort az M-sejtek P-faktor receptort termelnek és juttatnak a sejt felszínére. A feromonok kapcsolódnak megfelelő receptorukhoz és intracelluláris szignalizációs útvonalat indítanak el. A folyamat során a feromon receptorhoz kapcsolt G protein ismeretlen módon juttatja a szignált a mitogén-aktivált protein (MAP) kináz homológ kaszkádra, de a kaszkád aktiválódásához szükséges egy *ras1* homológ gén (*ste5*) terméke is (Yamamoto, 1996). A kaszkád tagjai a MAPKKK, a MAPKK és a MAPK. A MAPK aktivál egy eddig ismeretlen transzkripciós faktort, amely a P-sejtekben aktiválja a *mat1-Pm*, míg az M-sejtekben a *mat1-Mm* gén átírását.

Ezzel párhuzamosan megtörténik a sejtek konjugációja, aminek következtében a diploid zigótában jelen lesznek a *mat1-Pc*, *mat1-Mc*, *mat1-Pm*, *mat1-Mm* gének és termékeik. A *mat1-Pm*, *mat1-Mm* gének által kódolt transzkripciós faktorok együttes jelenléte ekkor már adott. Ez azért lényeges, mert a meiózis elindításához szükséges *mei3* gén átírásához mindkét transzkripciós faktor koexpressziója szükséges (Yamamoto, 1996). Tehát a *mei3* gén csak a diploid zigótában íródik át. A gén által kódolt protein a *pat1p* protein kinázhoz kapcsolódik, így azt inaktíválja. A *pat1p* kináz inaktíválódása miatt megszűnik a *ste11p* transzkripciós faktor által már előzőleg aktivált *mei2* gén termékén meglévő negatív kontrol és a sejt belép a meiózisba (Yamamoto, 1996). Megtörténik a premeiotikus DNS szintézis és a meiózis I. A meiózis II-höz már a *mes1* gén és a *cdc2* gén terméke szükséges. A meiózis lezajlása után a *spo* gének termékei szükségesek a spóráképzéshez (Yamamoto és mtsi, 1997). Az ivari differenciálódás bármely pontján szerepet játszó génekben sérült mutánsok nem képesek a ciklus végrehajtására. Ezeket a mutánsokat steril mutánsoknak nevezzük.



## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *S. pombe* és *Escherichia coli* törzsek

A doktori munka során felhasznált törzseket az 1. táblázat tartalmazza. A felhasznált törzsre az eredmények megfelelő részeinél a törzs számával és genotípusának feltüntetésével hivatkozunk.

1. táblázat: A doktori munka során felhasznált törzsek.

Törzs	Genotípus	Forrás
0-1	L972 h <sup>-</sup>	U. Leupold, Bern
0-220	<i>leu1-32 ura4-D18</i> h <sup>90</sup>	J. Kohli, Bern
0-221	<i>ura4-D18</i> h <sup>90</sup>	U. Leupold, Bern
0-3	L968 h <sup>90</sup>	U. Leupold, Bern
0-329	<i>ade6-M26 ura4-D18</i> h <sup>90</sup>	J. Kohli, Bern
0-39	<i>leu1-32</i> h <sup>+</sup>	U. Leupold, Bern
0-38	<i>leu1-32</i> h <sup>-</sup>	U. Leupold, Bern
2-511	<i>sep10-412 ura4-D18</i> h <sup>90</sup>	Grallert és mtsi, 1999
2-684	<i>sep10-412 ade3-58</i> h <sup>90</sup>	Grallert és mtsi, 1999
2-706	<i>sep10-412 ura4-D18 leu1-32</i> h <sup>90</sup>	Grallert és mtsi, 1999
2-841	<i>sep10-412 ade6-M210 int::pUC ura4<sup>+</sup> ::ade6-M26 ura4-D18 leu1-32 lys1-131</i> h <sup>-</sup>	saját izolálás
2-896	<i>sep11::ura4 ura4-D18 leu1-32</i> h <sup>90</sup>	saját izolálás
2-897	<i>sep11::ura4 ura4-D18</i> h <sup>90</sup>	saját izolálás
2-921	<i>sep10::ura4 ura4-D18 ade6-M26 leu1-32</i> h <sup>90</sup>	saját izolálás
2-923	<i>sep10::ura4 ura4-D18 lys1-131</i> h <sup>90</sup>	saját izolálás
2-924	<i>sep10::ura4 ura4-D18 lys1-131 leu1-32</i> h <sup>90</sup>	saját izolálás
2-927	<i>sep11-556 leu1-32</i> h <sup>90</sup>	Grallert és mtsi, 1999
2-928	<i>sep11-556 ura4-D18</i> h <sup>90</sup>	Grallert és mtsi, 1999
2-929	<i>sep10-412 lys1-131</i> h <sup>+</sup>	Grallert és mtsi, 1999
3-580	<i>ste11::LEU2 leu1-32 ura4-D18</i> h <sup>90</sup>	O. Nielsen, Koppenhága
3-61	<i>ade6-469 int::pUC ura4<sup>+</sup> ::ade6-M26 ura4-D18</i> h <sup>90</sup> (PS1)	Schubert és mtsi 1988
3-62	<i>ade6-469 int::pUC ura4<sup>+</sup> ::ade6-M26 ura4-D18 leu1-32</i> h <sup>-</sup>	saját izolálás
D1	<i>ade6<sup>+</sup>/ade6-M26 leu1-32/leu1<sup>+</sup> ura4-D18/ura4-D18</i> h <sup>90</sup> /h <sup>90</sup>	saját izolálás
DH5α	F <sup>-</sup> ( <i>φ80dΔ(lacZ)M15</i> ) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>	A. M. Carr, Anglia

## *S. pombe* és *E. coli* tápközégek

A doktori munka során használt tápfolyadékok és táptalajok összetételét, valamint a használt kiegészítő oldatokat a 2. és 3. táblázatok tartalmazzák (Gutz és mtsi, 1974; Sipiczki és Ferenczy 1977; Alfa és mtsi 1993; Egel és mtsi, 1994). A sejtek növekedéséhez és vizsgálatához használt tápközegről az eredmények megfelelő részénél teszünk említést. A használt minimál tápközéget kiegészítővel (aminosav illetve nukleotid) láttuk el, ha a törzs genotípusa ezt megkívánta.

## *S. pombe* klasszikus genetikai módszerek

A klasszikus genetikai módszereket a Gutz és mtsi 1974 által leírt módszerekkel végeztük. A *sep10<sup>-</sup>* illetve *sep11<sup>-</sup>* törzsek sterilizációja megakadályozta azok bármely más törzzsel történő hagyományos keresztezését, ezért ezen törzsek keresztezéseit szomatikus sejthibridizálással (protoplaszt fúzió) (Sipiczki és Ferenczy, 1977) végeztük, amelynek protokolját az alábbiakban röviden ismertetjük.

1. A sejteket YEL-ben log fázisig növesztettük.
2. Lecentrifugáltuk, majd a sejteket 5 ml 0,65 M KCl oldattal átmostuk.
3. Újabb centrifugálás után a sejteket 2 ml, 2 mg/ml 0,65 M KCl-ban oldott Lysing-enzim (Sigma L1412) oldatban felfuszpendáltuk.
4. A protoplasztokat kialakulásuk után (kb. 30-60 perc) 5 ml 1,2 M szorbit oldattal kétszer átmostuk.
5. A második mosás előtt a fuzionálódó törzseket összekevertük 5 ml 1,2 M szorbitban.
6. A második centrifugálás után visszamaradt üledéket 30%-os PEG 6000 és 0,1 M CaCl<sub>2</sub> 9:1 arányú keverékének 2 ml-ével felfuszpendáltuk, majd 25 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk.
7. Ezután a 2 ml protoplaszt szuszpenzióhoz 10 ml 45 °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 fedőaggal lemostuk, és ezt is további három csésze szSMA-ra szélesztettük.
8. 4-5 napos inkubálás után a fúziós termékek megjelentek, telepeket formálva a fedőagaron, ahonnan minimál táptalajra (SMA) izolálhattunk néhány különálló telepet.

2. táblázat: A felhasznált tápfolyadékok és táptalajok összetétele és specialításai. K: komplett, M: minimál.

<b>TÁPFOLYADÉK</b>	<b>YEL (K)</b>	<b>SML(M)</b>	<b>EMML(M)</b>	<b>MB(M)</b>	<b>MSL(M)</b>	<b>LB(K)</b>
Összetétel (1000 ml desztillált vízben)	5 g élesztő kivonat 30 g glükóz	5g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 g MgSO <sub>4</sub> 10g glükóz 1 ml sárga vitaminkeverék	3g Kálium-hidrogén ftalát 5,5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O 5g NH <sub>4</sub> Cl 20g glükóz 20ml sóoldat 1ml vitaminoldat (1000x) 0,1ml nyomelemoldat (10000x)	5g glükóz 0,5g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,36g kálium-acetát 0,5g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,1g NaCl 0,1g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 5g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1ml vitaminoldat (1000x) 0,1ml nyomelemoldat (10000x)	10g glükóz 2g arginin hidroklorid 1g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1g NaCl 0,2g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,1g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1ml TE 1ml BIO 2ml Vit	10g Bacto Trypton 5g élesztő kivonat 10g NaCl
<b>TÁPTALAJ</b>	<b>YEA</b>	<b>SMA</b>	<b>EMMA</b>	<b>-</b>	<b>MSA</b>	<b>LBA</b>
Összetétel (1000 ml)	YEL+20g agar	SML+20g agar	EMML+20g agar		MSL+20g agar	LB+12g agar
Aminosav kiegészítés	50 mg/l minden egyesből (750 mg/100 ml steril desztillált vizes törzsoldatból)					
Nukleotid kiegészítés	50 mg/l minden egyesből (375 mg/100 ml steril desztillált vizes törzsoldatból)					
<b>SPECIALITÁS</b>		<b>szSMA</b>	<b>EMMA+tiamin</b>		<b>1. MSL-N</b>	
					<b>2. MSA+tiamin</b>	
Összetétel: (1000 ml)		SMA+1.2 M szorbit	EMMA+5mg/l tiamin		1. MSL arginin hidroklorid nélkül 2. MSL+ 20 g agar + 5mg/l tiamin	

### 3. táblázat. Az egyes tápfolyadékokhoz használt kiegészítő oldatok összetétele

Kiegészítő oldat	sárga vitaminkeverék	vitaminoldat (1000x)	nyomelemoldat (10000x)	TE	BIO	Vit
Összetétel (100ml desztillált vízben)	0,2mg folsav 0,2mg biotin 40mg Ca-pantotenát 200mg inozitol 40mg niacin 20mg p aminobenzoosav 40mg pyridoxin.HCl 40mg tiamin 20mg riboflavin	0,1g pantothen sav 1g nikotin sav 1g myo-inositol 1mg biotin	0,5 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0,4 g MnSO <sub>4</sub> 0,4 g ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O 0,2g/ FeCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O 40mg molibdén sav 0,1g KI 40mg CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O 1 g citrom sav	50mg H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> 5mg CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O 10mg KI 20mgFeCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O 50mg MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O 15mg MoO <sub>3</sub> 40mg ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1mg Biotin 50ml Etanol 50ml desztillált víz	0,1g Kalcium pantotenát 1g Nikotinsav 1g Meso-inositol

#### Molekuláris biológiai módszerek

Az általános DNS módszerek kivitelezését Sambrook és mtsi (1989) alapján végeztük. A plazmid DNS-ek felszaporításához és izolálásához a DH5α F<sup>-</sup> (*φ80dΔ(lacZ)M15*) *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169* genotípusú *E.coli* sejteket használtuk. Ahol nem szerepel részletes leírás a *S. pombe* DNS módszerekkel kapcsolatban, ott a Moreno és mtsi (1991) által leírt módszereket alkalmaztuk. A doktori munka során használt vektorokról a 4.9 fejezetben található információ. A felhasznált pUD18 vektort illetve PSP1 genomikus könyvtárat Barbet és mtsi (1992) írták le. A szubklonozásokat minden esetben restriktációs emésztésekkel és ligálással végeztük pUR18N vektorban (4.9, Barbet és mtsi 1992). Ahol arra szükség volt, az egyszálú ragadós DNS végek feltöltését T4 polimeráz (MBI Fermentas) segítségével végeztük, a gyártó protokollja szerint. A *sep11* cDNS klónozásához (5.2.3) használt cDNS könyvtárt Prof. Juan Jimenez (Sevilla-i Egyetem), a *ste11p* protein túltermeltetéséhez (5.3.2) használt, a *ste11* gén kódoló régióját tartalmazó plazmidkonstrukciókat Dr. Olaf Nielsen (Koppenhágai Egyetem) bocsátotta rendelkezésünkre. A felhasznált két plazmidről (PSK66 és PSK85) további információ a 4.9 illetve 4.10 fejezetekben található.

DNS szekvenciát minden esetben pUR18N plazmidba klónozott fragmenten, pUR18N specifikus T4, T7, M13 univerzális primerek, illetve az általunk univerzális primer/ek segítségével előzetes meghatározott fragment szekvencia felhasználásával tervezett fragment specifikus primerek és ABI PRISM (2.1.0 Modelszámú) automata szekvenáló berendezés segít-



ségével határoztunk meg. Az automata szekvenálást a Szegedi Biológiai Központban (SZBK) végeztettünk. Fragment specifikus primereket az S10-5 klón genomialis inzertjének, illetve a *sep10* gén és az azt határoló DNS szakasz szekvenciájának meghatározásánál használtunk (lásd 5.1.2).

A *sep10* és *sep11* gének klónozása részénél (5.1 illetve 5.2.1) leírt plazmidok izolálását Moreno és mtsi (1991) által leírt módszerrel végeztük. A DNS fragmentek gélből történő izolálásához a GeneClean Kit-et (Bio 101) használtuk, a gyártó cég által ajánlott protokoll szerint.

A *sep10::ura4<sup>+</sup>* konstrukció PCR segítségével történő felszaporításához az 5'-CATAACTATCTCAATATC-3' (SZS1) és 5'-GTCAAGTAATTGTTTCG-3' (SZS2) primereket használtuk. A *sep11* cDNS klónozásához az 5'-CGGGATCCCGATGCAAGAACTGTATCTTTA-3' (SZS3) és 5'-CGGGATCCCGCATGTGTATAGACGTGTAA-3' (SZS4), illetve a *sep11::ura4<sup>+</sup>* konstrukció felszaporításához az SZS3 és az 5'-GCATTATCATTGCAGTATTTGT-3' (SZS5) primereket használtuk. Az SZS3 és SZS4 primerek szekvenciájának aláhúzott része a *sep11* kódoló régiójával specifikus szekvencia (a 23. ábrán is feltüntetve), az aláhúzás nélküli rész pedig *Bam*HI restrikciós hasító enzim felismerési szekvenciája, amely lehetővé tette a PCR termék klónozását pUR18N plazmidba.

A *sep10* és *sep11* gének megszakítását, azaz a megszakítós konstrukció helyes beintegrálódását Southern blottal ellenőriztük (lásd 5.1.5 illetve 5.2.4). Ehhez a sejtekből a kromoszómális DNS-t Alfa és mtsi (1993) által leírt módon izoláltuk. 10µl kromoszómális DNS-t a *sep10* esetében *Pst*I-*Bam*HI (emésztés után egy ~4.0 kb-nyi fragmenten található a *sep10* gén) restrikciós enzimekkel emésztettünk, 1%-os agaróz gélen megfuttattuk, majd a Roche Biochemicals DIG High-Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (katalógus szám: 1585614) termékének útmutatásai szerint blottoltunk és hibridizáltunk. A hibridizációhoz próbaként az SZS1 és SZS2 primerek és az S10-5 plazmid mint templát segítségével PCR reakcióval felszaporított és tisztított, *sep10* kódoló régiót tartalmazó DNS szakaszt használtuk, amelynek DIG-UTP-vel történő jelölését és hibridizáció után a szignál detektálását szintén az említett kit útmutatásai szerint végeztük. A *sep11* esetében megegyező módon jártunk el, azzal a különbséggel, hogy a kromoszómális DNS-t *Bam*HI-*Eco*RI (emésztés után szintén ~4.0 kb-nyi fragmenten található a *sep11* gén) enzimekkel emésztettük és hibridizációs pró-

baként az SZS3 és SZS5 primerek és S11-6 plazmid mint templát segítségével végzett PCR reakció tisztított termékét használtuk.

### RNS izolálása, Northern-blot, hibridizálás és detektálás

A *ste11* mRNS szint méréséhez totál RNS-t  $\sim 2 \times 10^8$ -on mennyiségű sejtől izoláltunk az RNeasy Mini kit (Qiagen, Kat. szám: 74106) segítségével, a gyártó ajánlásának megfelelően. 10  $\mu$ g izolált RNS-t 1,5%-os formaldehid gélen megfuttattunk, majd Hypobond-N membránra (Amersham) blottoltuk, majd hozzá  $^{32}\text{P}$ -vel jelölt *ste11* antiszensz RNS próbát 2 napon keresztül 42 °C-on hibridizáltunk. Az antiszensz RNS próba előállításához a *ste11* kódoló régió *BglI-PstI* fragmentjét pGEM3 plazmidba (Promega Inc., 4.9) klónoztuk, majd a gyártó protokollja szerint végeztük az in vitro transzkripciót és a jelölést. A kontrollként használt *cdc2* mRNS szint méréséhez a Nielsen és Egel (1990) által előállított pGEM plazmidba klónozott *cdc2* próbát használtuk, jelölését a fenti gyártó protokollja szerint végeztük. A *cdc2* próbával történő hibridizálást megelőzően eltávolítottuk a *ste11* próbát a membránról (Nielsen és Egel, 1990 szerint). A hibridizálást követően a szignált mindkét esetben röntgen filmen detektáltuk.

### A *S. pombe* sejtek transzformálása

A sejteket Li-acetátos-os módszerrel, Okazaki és mtsi (1990) által leírtak alapján transzformáltuk, a következő protokoll szerint:

1. Az auxotrófiáknak megfelelően kiegészített MB minimál tápfolyadékban a log fázis felső határáig szaporítottuk a tenyészetet ( $\text{OD}_{595} < 0,5$ ).
2. A lecentrifugált (4000rpm, 5-10 perc) sejteket 5-10 ml steril vízzel mostuk, majd 1 ml 0,1 M Li-acetátban (pH 4,9) szuszpendáltuk, majd centrifugáltuk (10000 rpm, 30 sec)
3. A felülúszót elöntöttük, majd a sejteket felszuszpendáltuk 0,1 M Li-acetátban (pH 4,9) úgy, hogy koncentrációjuk  $1-5 \times 10^9$  sejt/ml legyen. A *sep10* és *sep11* gének klónozása érdekében a genomiális könyvtárral történő transzformálás esetén 300  $\mu$ l ( $3-15 \times 10^8$ ) sejtet transzformáltunk. Egyéb transzformálás esetén 100  $\mu$ l ( $1-5 \times 10^8$  sejt) térfogatokat használtunk.
4. 60 (-120) percet előinkubáltunk 30 °C-on.
5. Ezután genomiális DNS könyvtárral történő transzformálás esetén 5  $\mu$ g (10-15  $\mu$ l) DNS-t és 870  $\mu$ l 30 °C-os 50 %-os PEG 4000 oldatot adtunk a sejtekhez. Plazmid

DNS-el történő transzformálás esetén 1 µg (1-7 µl) plazmid DNS-t, míg a megszakítá-  
sos konstrukciót tartalmazó (lásd 5.1.5 és 5.2.4) lineális DNS-el történő transzformá-  
lás esetén ~20 µg (10-15 µl) tisztított PCR terméket és 290 µl 30 °C-os 50 %-os PEG  
4000 oldatot adtunk a sejtekhez. DNS könyvtár illetve lineális konstrukció transzfor-  
málása esetén a transzformáló DNS hozzáadása előtt 2 µl (2 µg/µl) hering sperma kar-  
rier DNS-t adtunk a sejtekhez. A sejteket 60 percet inkubáltunk 30 °C-on.

6. Ezt követően a sejteket 15 percig 43 °C-on inkubáltuk (hő sokkoltuk).
7. 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk a sejteket (pl. 4000 rpm, 5-10 perc), és jól leszívtuk a felülúszót.
8. 1 ml YEL tápfolyadékban felfuszpendáltuk és 30 °C-on 60-180 percig rázattuk.
9. A sejteket 100-200 µl-enként szélesztettük a transzformálás céljának megfelelően kiegészített EMMA táptalajra.
10. A transzformálás céljának megfelelő hőmérsékleten a sejteket inkubáltuk.

#### Plazmid stabilitási teszt

A *S. pombe* sejtjeibe transzformált plazmidok stabilitásának vizsgálatát Moreno és mtsi (1991) alapján az alábbi protokoll szerint végeztük.

1. A transzformáció után EMMA (szelektív) táptalajra izolált telepekből néhányat (3-5) 5-10 ml YEL tápfolyadékba oltottunk és 2-3 napig 30 °C-on inkubáltuk, majd számolt mennyi-  
séget YEA táptalajra szélesztettük és a telepek megjelenése után a csészéket minimál tápta-  
lajra (SMA) replikáltuk, majd 2-3 nap után kiértékeljük.

2. Azok a sejtek, amely a nem szelektív körülmények közötti tenyésztés eredményekép-  
pen elvesztették a plazmidot, nem voltak képesek növekedni minimál táptalajon. Ahol erre  
szükség volt, ott az egyes telepek sejtjeinek fenotípusát is ellenőriztük.

#### Szekvenciák analíziséhez használt bioinformatikai módszerek

A nukleinsav és protein szekvenciák részletes analizisét és grafikai megjelenítését az  
OMIGA 1.1 (Oxford Molecular Group) szoftvercsomag segítségével végeztük. A szekvencia  
homológia vizsgálatokat az NCBI (National Center For Biotechnology Information,  
<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>) és a Sanger Center (<http://www.sanger.ac.uk>, a *S. pombe*  
genom projekt hivatalos adatbázisa) szerverek BLAST szolgáltatása felhasználásával végez-

tük. A *sep10p* minden egyes identifikált szekvencia homológját az NCBI szerver kétszeres szekvencia illesztést (pairwise alignment) biztosító „BLAST2 sequences” szolgáltatása segítségével a *sep10p* proteinnel páronként is összehasonlítottuk. A *sep10p* protein szekvencia homológjainak többszörös illesztését (multiple alignment), valamint a *sep11* genomiális DNS és cDNS szekvenciák páros illesztését a ClustalW 1.8 algoritmus szerint a BCM szerver (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) felhasználásával végeztük. Az illesztések eredményeinek megjelenítését (16. és 22. ábra) a BOXSHADE3.21 szolgáltatás ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) felhasználásával készítettük.

A *homológia* kifejezés használata nem egységes a szakirodalomban, egyes szerzők szekvenciájukban hasonló protein, illetve DNS szakaszok esetén használják, míg mások funkcionális hasonlóságot fejeznek ki a *homológia* szóval. A dolgozatban az előbbi szóhasználatot alkalmazzuk, azaz a szekvencia elemzések során kimutatott szekvenciájukban hasonló protein szakaszok esetén a homológ, illetve szekvencia homológ kifejezést használjuk, így a kifejezéssel nem funkcionális hasonlóságra utalunk.

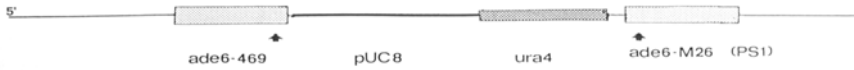
#### A mitotikus rekombinációs ráta kísérleti mérési módszere

A *sep10-412* mutáció mitotikus rekombinációra való hatásának vizsgálatához az alábbiakban ismertetett módszert használtuk. A módszer a *S. pombe* kromoszómális *ade6*-os lókuszába integrált *ade6* allélduplikáció közötti rekombináció mérésén alapul (Sipiczki és mtsi, 1990). A duplikációt hordozó törzset Schuchert és Kohli (1988) készítették, úgy, hogy egy olyan plazmidot integráltak az *ade6-M26 ura4-D18 h<sup>90</sup>* törzs sejtjeibe, az *ade6*-os lókuszbba, amely tartalmazta az *ade6-L469*-es allélt és az *ura4<sup>+</sup>* gént (7.A ábra). A helyes integráció következtében kialakuló 3-61 *ade6-L469 int::pUC ura4<sup>+</sup> ::ade6-M26 ura4-D18 h<sup>90</sup>* törzs fenotípusa *ade<sup>-</sup> ura<sup>+</sup>*.

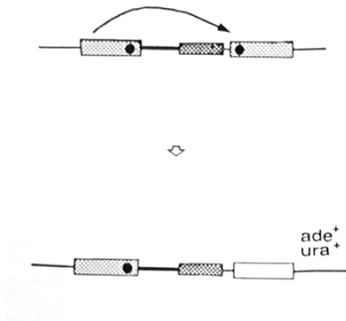
A mutáns *ade6*-os allélok közötti génkonverzió vad típusú allélt eredményez, így a sejtek *ade<sup>+</sup> ura<sup>+</sup>* fenotípusúvá válnak (7.B ábra). Az *ade6*-os allélok közötti crossing-over a közöttük elhelyezkedő plazmid, és így *ura4* gént tartalmazó DNS szakasz elvesztésével jár, ami *ade<sup>+</sup> ura<sup>-</sup>* fenotípussal jár (7.C ábra). Így az egyes rekombinációk eredményeképpen kialakuló fenotípusok arányának meghatározásával megbecsülhetjük a mitotikus génkonverzió és a crossing-over arányát.

A mitotikus rekombináció *sep10-412* mutáns háttérben történő meghatározásához a 3-61 *ade6-L469* int::pUC *ura4<sup>+</sup> ::ade6-M26 ura4-D18* h<sup>90</sup> törzsbe egy *leu1-32* markert vittünk, 0-39 *leu1-32* h<sup>-</sup> törzssel történő hagyományos keresztezéssel és a megfelelő genotípusú sejtek izolálásával, így előállítva 3-62-t, amely alkalmas volt a *sep10-412* mutációt tartalmazó sej-

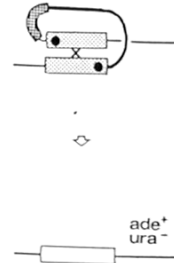
A.



B.



C.



7.ábra A. A PS1 törzs *ade6*-os lókuszába integrált konstrukció szerkezete. B. A gén konverzió folyamatának sémája, és annak eredménye (*ade<sup>+</sup> ura<sup>+</sup>*) C. A crossing-over folyamatának sémája és annak eredménye (*ade<sup>+</sup> ura<sup>-</sup>*)

tekkal való keresztezésre protoplaszt fúzió segítségével. Ezután a 3-62 *ade6-M210* int::pUC *ura4<sup>+</sup> ::ade6-M26 ura4-D18 leu1-32* h<sup>-</sup> törzset a 4.3 pontban leírt módon protoplaszt fúzióval kereszteztük a 2-929 *sep10-412 lys1-131* h<sup>+</sup> törzssel. A diploidokat SMA táptalajra izoláltuk, és két nap inkubáció után MSA spróztató táptalajra replikáztuk. Az aszkuszképzést követően a sejteket  $\beta$ -glukuronidáz enzimmel egy napig kezeltük, hogy a sejtek és az aszkuszok falát elroncsoljuk. Ezután a spórák számolt mennyiségeit szélesztettük YEA táptalajra, majd 4-5 napig inkubáltuk. A megjelenő telepek közül azokat izoláltuk, amelyek a duplikációra jellemző szektorosságot (Schuchert és mtsi, 1988) és a *sep10-412*-re jellemző láncos fenotípust mutatták, így izolálva a 2-841 *sep10-412 ade6-M210* int::pUC *ura4<sup>+</sup> ::ade6-M26 ura4-D18 leu1-32 lys1-131* h<sup>-</sup> törzset.

A rekombinációs ráta meghatározásához a következő kísérletet végeztük el. A 2-841 és kontrollként a 3-62 törzsek sejteinek számol mennyiségét szélesztettük YEA-ra, majd inkubáció után a nagyjából egyforma méretű telepeket – amelyek nem egyforma inkubációs idő után keletkeztek, lévén a *sep10-412* mutáns sejtciklusideje hosszabb (Grallert és mtsi, 1999) – 80 µl steril vízben szuszpendáltuk. Minden egyes szuszpenzióból 30 µl-t a 2-841 esetén EMMA+leucin+lysin, a 3-62 esetén EMMA táptalajokra, valamint 30 µl-t a 2-841 esetén EMMA+leucin+lysin+uracil, illetve a 3-62 esetén EMMA+uracil táptalajokra szelészttünk. A maradék 20 µl-t a sejtszám meghatározásához használtuk, kétféle módon: Bürker-kamra segítségével, illetve számolt mennyiségek YEA-ra történő szélesztésével. Inkubálás után a gékonverzió, illetve crossing-over események arányát az  $ade^+ ura^+$  illetve  $ade^+ ura^-$  fenotípusú telepek számából határoztuk meg (lásd 5.1.4).

### A sejtek UV és nitrozoguanidin érzékenységének mérése

#### UV-érzékenység mérése

A sejteket YEL tápfolyadékban log fázisig tenyésztettük, majd kiszámított mennyiségeket YEA táptalajra szélesztettünk, és 5-5 csészét 0, 10, 20, 30, 40 másodpercig UV fényforrás (15 W-os Cole Palmer UV lámpa, 254 nm tartomány) alá helyeztük. A csészék minden esetben 12 cm-re voltak a fényforrástól. A kezelés után a csészéket 30°C-on inkubáltuk. A néhány nap után a csészéken megjelenő telepeket megszámláltuk és a 0 időponthoz viszonyított túlélési arányukat kiszámoltuk.

#### Nitrozoguanidin-érzékenység mérése

A sejteket YEL tápfolyadékban log fázisig tenyésztettük. Számukat meghatároztuk, és  $10^6$  sejthez nitrozoguanidin törzsoldat (1,5 mg/ml) eltérő mennyiségeit adtuk, a 4. táblázat szerint, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután kiszámított mennyiségeket szélesztettünk YEA táptalajra, majd 30 °C-on inkubáltuk. A néhány nap után a csészéken megjelenő telepeket megszámláltuk és a 0 nitrozoguanidin koncentrációhoz viszonyított túlélési arányukat kiszámoltuk.

4. táblázat A nitrozoguanidin-érzékenység mérésénél alkalmazott hígítási sor.

Sejtszám ( $10^6$ )	Nitrozoguanidin törzsoldat mennyisége ( $\mu$ l)	steril víz mennyisége ( $\mu$ l)	Össztérfogat ( $\mu$ l)
200 $\mu$ l	0	800	1000
	30	770	
	60	740	
	100	700	
	150	650	
	180	620	

### Mikroszkópia

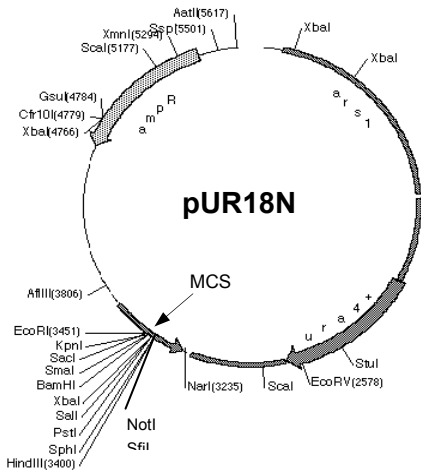
A sejtek morfológiáját és a sporulációt differenciális interferencia kontraszt (DIC) mikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket Forte 400-as filmekre fényképeztük.

### Plazmidok

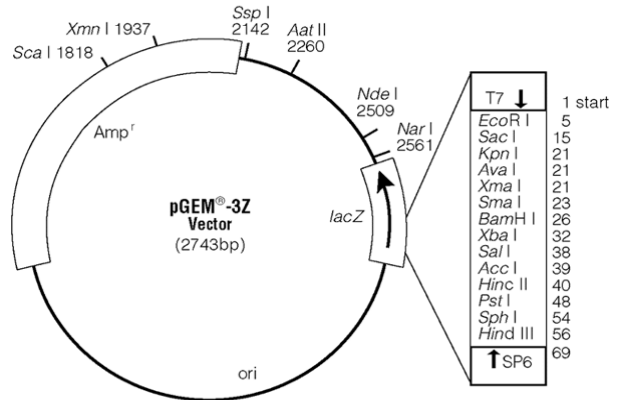
A doktori munka során használt plazmidok fontosabb adatai az 5. táblázatban találhatóak, illetve egyes plazmidok térképei a 8., 9., 10., 11. ábrákon láthatóak. Az eredmények megfelelő részénél utalunk arra, hogy az adott feladathoz melyik plazmidot alkalmaztuk.

5. táblázat A doktori munka során használt plazmidok fontosabb adatai.

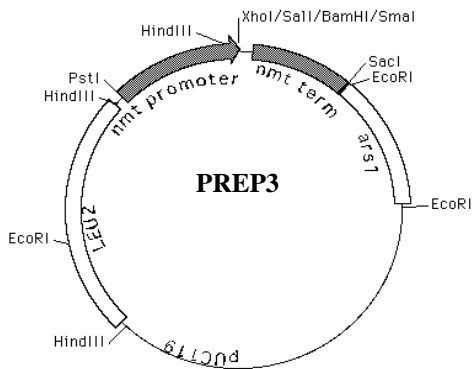
Név	Méret Kb	Referencia	<i>E. coli</i>		<i>S. pombe</i>	
			rep.ori	marker	rep.ori.	marker
pUR18N	5,6	Barbet és mtsi, 1992	+	amp.	+	<i>ura4</i>
pGEM3Z	2,7	Promega Inc.	+	amp.	-	-
pREP3	8,9	Maundrell, 1993	+	amp.	+	LEU2
pREP4	8,5	Maundrell, 1993	+	amp.	+	<i>ura4</i>
pJK148	5,5	Keeney és Boeke, 1994	+	amp.	-	<i>leu1</i>
PSK66	9,9	Olaf Nielsen	+	amp.	+	<i>ura4</i>
PSK85	10,3	Olaf Nielsen	+	amp.	+	LEU2



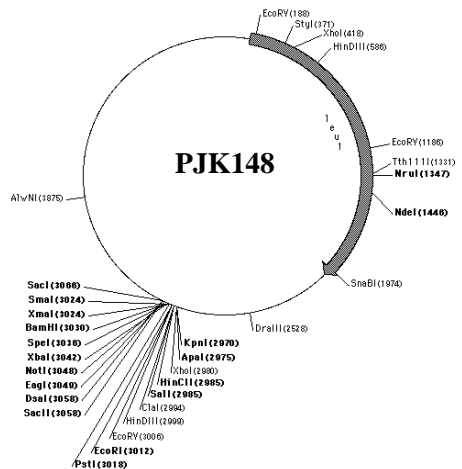
8. ábra A pUR18N plazmid térképe.  
Forrás: <http://pingu.salk.edu/~forsburg/vectors.html#exp>



9. ábra A pGEM3Z plazmid térképe.  
Forrás: <http://www.promega.com/figures/frame.asp?fn=0278va>



10. ábra A pREP3 plazmid térképe.  
Forrás: <http://pingu.salk.edu/~forsburg/vectors.html#exp>



11. ábra A pJK148 plazmid térképe.  
Forrás: <http://pingu.salk.edu/~forsburg/vectors.html#exp>



## A pREP plazmidok felhasználása a *ste11* túltermelésére

A pREP plazmidcsalád tagjai expressziós plazmidok, indukálható promotert tartalmaznak, így a mögéjük épített gén (ORF) szabályozott expressziója lehetséges. Ennek megfelelően a pREP plazmidok kiválóan használhatóak proteinek irányított túltermeltetésére a *S. pombe*-ban (Maundrell, 1993).

A pREP plazmidok úgynevezett *nmt* promotere a *S. pombe* tiamin szintézisében résztvevő *nmt1* gén promotere, amely tiamin jelenlétében maximális repressziót, azonban tiamin hiányában magas expressziót mutat. A gén promotert és terminátorát tartalmazó DNS fragmenteket megfelelő plazmidba klónozták, előállítva a replikatív pREP (pREP3 *LEU2* markerrel, pREP4 *ura4* markerrel) és az integratív pRIP vektorokat (Maundrell, 1993). A promoter irányított mutagenézisével közepes (pREP41/42) és alacsony (pREP81/82) expressziót biztosító vektorot is előállítottak, többféle markerrel (Basi és mtsi, 1993).

A doktori munka során a közepes expressziót biztosító pREP41 (*LEU2* markerű) és pREP42 (*ura4* markerű) vektorokba klónozott *ste11* ORF-et hordozó plazmidokat transzformáltuk megfelelő sejtekbe (lásd 5.3.2). A plazmidkonstrukciókat sorrendben PSK66 és PSK85 vektoroknak nevezzük és azokat Dr. Olaf Nielsen (Koppenhágai Egyetem, Molekuláris Biológiai Intézet) bocsájtotta rendelkezésünkre (lásd 4.9). A plazmidokat tartalmazó sejtek így a tápközegbe adott tiamin jelenlétében nem mutatnak *ste11* expressziót, míg tiamin hiányában a gén expresszálódik, ami a *ste11* protein túltermelésével jár.

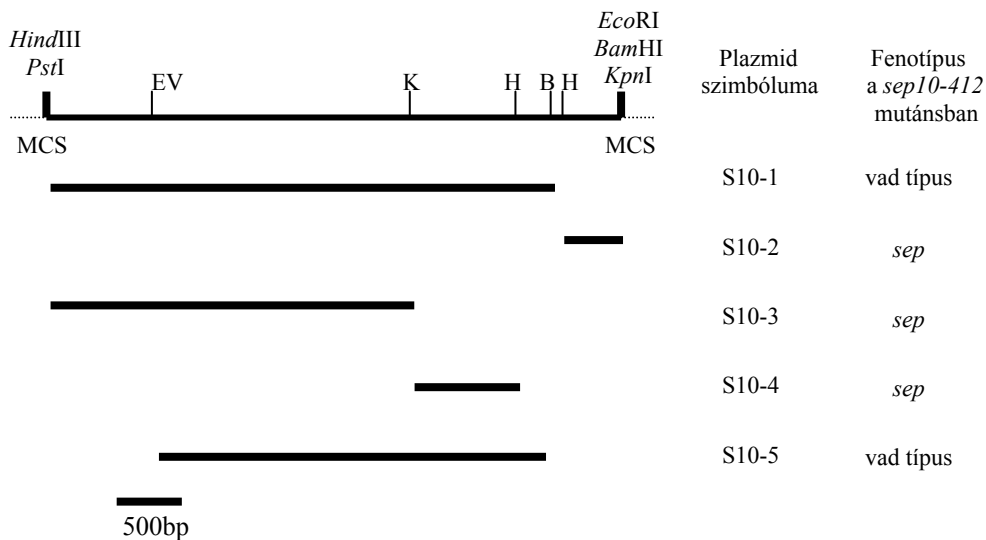
## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 A *sep10* gén klónozása

#### 5.1.1 A *sep10* gén klónozása genomiális könyvtárból

A *sep10* gén klónozásához az élesztő molekuláris genetikában elterjedt komplementáción alapuló klónozási technikát használtuk. Ennek feltétele, hogy a klónozáshoz valamilyen szelekciós rendszer álljon rendelkezésre. Esetünkben a *sep10-412* mutáns törzs hőmérsékletérzékenysége és sterilitása (Grallert és mtsi, 1999) adott jó szelekciós rendszert. Ennek megfelelően a 2-511 *sep10-412 ura4-D18 h<sup>90</sup>* törzs sejtjeit a 4.4.2 pontban leírt módszerrel PSP1 genomiális könyvtárral (Barbet és mtsi, 1992) transzformáltuk. A szelektív táptalajra készített sejtet tartalmazó csészéket (egy kivételével, ezt transzformációs kontrollnak használtuk) restriktív hőmérsékleten inkubáltuk. Az 5-6 nap után a csészéken megjelent transzformánsokat szelektív táptalajra (EMMA) izoláltuk, és velük minden esetben a 4.4.3 pontban részletesen leírt plazmid stabilitási tesztet végeztük el. A teszt segítségével megmutatható az, hogy a feltételezett pozitív klónok komplementált fenotípusát valóban a felvett plazmid jelenléte okozza. Azokból a transzformánsokból, amelyek plazmid stabilitási tesztje pozitívnak bizonyult, azaz a plazmid elvesztése együttjárt a vad fenotípus elvesztésével, és a *sep* fenotípus megjelenésével, a plazmidot a 0 pontban leírt módszerrel izoláltuk. Az izolált plazmidot további ellenőrzés végett visszatranszformáltuk a 2-511 *sep10-412 ura4-D18 h<sup>90</sup>* sejtbe, hogy a komplementációs képességét ellenőrizzük.

A fent leírt módszerrel két olyan plazmidot izoláltunk, amelyek minden követelménynek megfeleltek. A plazmidok restriktív analízise és a későbbiek során végzett Southern hibridizációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a két plazmid átfedő genomi régiót tartalmazott. Így a továbbiakban csak az egyik plazmiddal dolgoztunk, amelyet S10-0-nak nevezünk el. Elkészítettük az S10-0 plazmid durva restriktív térképét és elvégeztük szubklónozását. A szubklónok előállításánál a megfelelő szub-genomi fragmenteket minden esetben pUR18N plazmid megfelelő klónozó helyeire építettük. A szubklónozás eredményeként kialakuló szubklónokat (s10-1-től s10-5-ig számozva) a 12. ábrán tüntettük fel. A szubklónok *sep10-412* sejtbe történő transzformálása után megfigyelhető fenotípusai alapján feltételeztük, hogy a komplementációért felelős régió/gén az S10-3 és S10-4 szubklónok közötti DNS szakaszon helyezkedhet el (12. ábra), így a két szubklónt összekapcsoló *KpnI* restriktív endonukleáz valószínűleg belehasít a *sep10-412* mutációt komplementáló génbe.



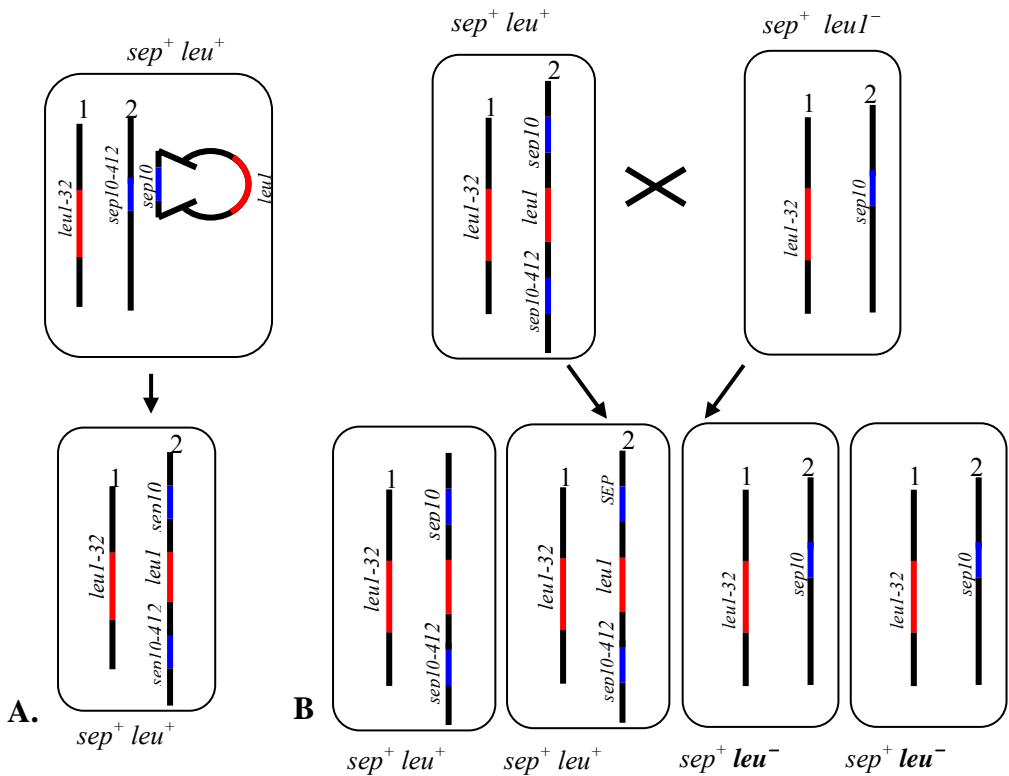
12. ábra A *sep10-412* mutációt komplementáló genomialis fragment szubklónozása pUR18N-ben és a szubklónok komplementációjának vizsgálata. EV: *EcoRV*, K: *KpnI*, H: *HindIII*, E: *EcoRI*, B: *BamHI*, MCS: multiple cloning site

### 5.1.1 Az S10-5 szubklón a *sep10* gént tartalmazza

Annak bizonyítására, hogy valóban a *sep10* gént és nem egy extragenikus szupresszort klónoztunk, a *sep10-412* mutációt komplementáló legkisebb genomialis fragmentet (s10-5) pJK148 integratív plazmidba (lásd 4.9, illetve Keeney és Boeke, 1994) klónoztuk (neve: s10-5JK). A konstrukcióval transzformáltunk 2-706 *sep10-412 ura4-D18 leu1-32 h<sup>90</sup>* sejteket, kontrollként pJK148, inzertet nem tartalmazó plazmidot használva. A pJK148-as plazmidon nem található *ars* (lásd 4.9), így a sejtben úgy képes megmaradni, hogy homológ rekombinációval integrálódik a genomba. Ha az integráció a plazmidban található inzert és a genomban megtalálható kromoszómális szakasz között játszódik le, akkor a plazmidot az inzerttel a sejt a genomi fragment mellett fogja tartalmazni (lásd 13A. ábra). Így ezen integráns sejteket vad típusú (*leu1-32* markert tartalmazó) sejtekkel visszakeresztezve, a kromoszómális szakasz és az inzert között szegregáció nem, rekombináció pedig csak igen ritkán játszódhat le. Ha tehát a klónozott fragment valóban a *sep10* vad típusú allélját hordozza, akkor az integránsok fenti visszakeresztezéséből nyert spórák között nem vagy rendkívül ritkán fordul elő *sep10<sup>-</sup>* fenotípusú egyed (lásd 13B. ábra). A fent vázolt kísérlet eredményeképpen kapott

transzformánsok (integránsok) közül néhányat izoláltunk. Az s10-5JK plazmiddal transzformált integránsok vad fenotípust mutattak, jelezve azt, hogy az integráció eredményeképpen a *sep10-412* allél mellett a *sep10*<sup>+</sup> allél is jelen van a genomban. Ezt plazmid stabilitási teszttel (4.4.3) is bizonyítottuk, a transzformánsok nem veszítették a plazmidot. A kontrollként pJK148 plazmiddal transzformált sejtek fenotípusának mikroszkópos vizsgálata mutatta, hogy a sejtek fenotípusa nem változott.

Az izolált integránsokat ezután protoplaszt fúzió (4.3) segítségével visszakeresztettük 0-39 *leu1-32* h<sup>-</sup> törzssel. Az integránsok vad fenotípusa lehetővé tette volna a hagyományos



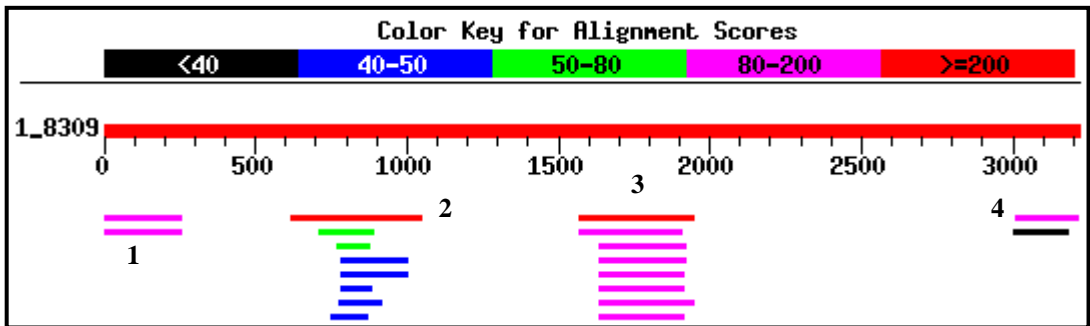
13. ábra A. Az integráció eredménye *sep10-412* mutánsban. B. Egy integráns visszakeresztése *leu1-32* törzssel és a keletkező spórák fenotípusa. Az ábrán a kromoszómák megfelelő helyei vannak jelölve egy modell sejtben. Piros színnel a mutáns (*leu1-32*) és a vad (*leu1*) allélok, míg kékkel a *sep10-412* mutáns és a *sep10* vad allélok vannak jelölve. A sejtben a fölött illetve alatt a megjelenő fenotípust tüntettük fel. *sep*<sup>+</sup>: vad fenotípus, *leu*<sup>+</sup>: leucin prototrófia

keresztezés is, azonban az integránsok  $h^{90}$  párosodási típusa miatt számos  $h^{90} \times h^{90}$  keresztezés zajlott volna le, ami rontotta volna a genetikai teszt kiértékelhetőségét. A protoplaszt fúzióval biztosítottuk, hogy csak integráns  $h^{90} \times leu1-32 h^-$  keresztezés történjen.

A protoplaszt fúzió eredményeképpen kapott diploid sejteket a Gutz és mtsi (1974) által leírt módon random spóraanalízisnek vetettük alá, amely során 30-50 spórából képzett telep fenotípusát ellenőriztük mikroszkóposan, illetve leucin proto- és auxotrófiára megfelelően kiegészített minimál táptalajon (SMA). A teszt eredménye azt mutatta, hogy a vizsgált izolátumok 1:1  $leu^+ : leu^-$  megoszlást mutattak, és nem produkáltak  $sep^-$  morfológiájú sejteket. Ez az eredmény alátámasztotta azt, hogy a 13B. ábrán vázolt esemény játszódott le, tehát az általunk klónozott genomiális fragment a *sep10* gént tartalmazta.

#### 5.1.2 A *sep10* egy intron nélküli gén és terméke egy konzervatív, feltehetően transzkripcióban szerepet játszó protein

A *S. pombe* genomiális DNS-ének szekvenciája ma már rendelkezésre áll (Wood és mtsi, 2002), azonban a *sep10* gén klónozásának idejében még csak részben volt ismert. Ezért a *sep10* gént tartalmazó genomiális fragment (S10-5, 12.ábra) szekvenciáját az egyik DNS szálon meghatároztuk. A szekvenáláshoz a pUR18N plazmidhoz kapcsolódó univerzális primert és a továbbszekvenáláshoz szekvencia specifikus szekvenáló primereket használtunk.



14. ábra A *sep10* gént tartalmazó 3.2 kb DNS fragment szekvenciájáról fordított protein szekvencia adatbázissal történő összehasonlításának eredménye. Számmal feltüntettük a nagyfokú homológiát mutató régiókat. 1: hipotetikus DNAJ protein, 2: hipotetikus protein, 3: a *sep10p*-nek megfelelő protein, 4: hipotetikus protein. A színes vonalak homológ proteineket jelölnek, hosszuk a homológ tartomány hosszával arányos. Forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Az egyes részszekvenciákat az előállítás időrendjében összehasonlítottuk a *S. pombe* genomszekvenciájával, ahol nem találtunk megegyező szekvenciát, ami jelezte, hogy a *sep10* gént tartalmazó régió szekvenciája akkor még nem volt megtalálható az adatbázisban.

A kapott 3218 bp-nyi szekvenciát használtuk ORF (Open Reading Frame) keresés és szekvencia homológia vizsgálatokhoz. ORF kereséshez a Genefinder (Chen és Zhang, 1998) elnevezésű, a *S. pombe*-nél használatos gén előrejelző programot használtuk. A program egy 420 bp-nyi intron nélküli ORF-et jelzett abban a régióban, amelybe a *sep10* gént a szubklónozás eredményei alapján vártuk. A 3218 bp-nyi DNS szekvenciáról lefordított protein szekvencia homológia vizsgálata (az NCBI szerverének BLASTX szolgáltatása segítségével) ebben a régióban jelentős homológiát mutatott több proteinnel (14. ábra), ami megerősítette azt, hogy a *sep10* gén valóban ebben a régióban található. Ezt a régiót szekvencia specifikus primerek segítségével a másik DNS szálon is megszekvenáltuk, majd ezt a 800 bp-nyi DNS szekvenciát elküldtük az adatbázisokba AF284581 hozzáférési szám alatt. A későbbi protein szekvencia analízisekhez az ebben a DNS szekvenciában megtalálható 420 bp-nyi *sep10* génről lefordított 139 aminosavból álló sep10p protein szekvenciát használtuk. Mindezen információ a 15. ábrán látható.

```

1   tattaacact tgtaaaatta aacagcttaa atgggagaaa ccatttagaa ccaatttttc
61  aactagagaa ttttaattta attaagaaat aaattgccgt tagaattgaa tttgtttact
121 ctttcaattt tctactcaoc atttagggag cccactatct ttacatatac ccgtagcgtt
181 cttagtggta gcacccaaaac caaatttttac caaatataca gatatatggt caagtaattg
241 tttcgattca atggaaacaa aatgggtact ttcaaaggtt cccgatgata agagtcggtt
      M E T K W L L S K V P D D K S R F
301 tgaattgag ttagaatttg tacaatgctt ttcaaatcca tggtagcctaa acttccttgc
      E I E L E F V Q M L S N P W Y L N F L A
361 ccagcacaaa tactttgaag atgaggcatt tttacagtac cttgaatata tggaaatttg
      Q H K Y F E D E A F L Q Y L E Y M E Y
421 gagggaacca gaatatgtga aattcataat ttatccaact tgcctgcaca tgttgacttt
      W R E P E Y V K F I I Y P T C L H M L T L
481 attaaaaaat ccgcaatttc gcaacgacat ttctagagcg gatttgcata agcagggttaa
      L K N P Q F R N D I S R A D L S K Q V N
541 tgatgaaatt tattatgaat ggtaggaaa aggtttgcag caatattgta gtgccgacga
      D E I Y Y E W L G K G L Q Q Y G S A D D
601 tgctactttg tctcagccgc agcaagagga agatgaaaag aaagttgacg tgaaaaagga
      A T L S Q P Q Q E E D E K K V D V K K E
661 aaatgaaatg aaagaggatg tatgtagata ttgagatagt tatggtaata tccacttact
      N E
721 tttttctcac atttttaaat ttcaatatcc aaaatcaagc aagatctctt atacaagcat
781 gtacttgaga aactcctgga

```

15. ábra A *sep10* kódoló régió és a lefordított sep10p protein, valamint a határoló DNS szakaszok szekvenciája. A kódoló régiót aláhúzással jelöltük. A megszakításos allél készítéséhez (lásd 5.1.5) felhasznált *KpnI* hasítóhely duplán van aláhúzva.

A sep10p protein homológia vizsgálata több nagyfokú homológiát mutató proteint mutatott ki. Ezek közül két protein ismert és karakterizált, a többi öt nagyfokú homológiát mutató protein pedig a megfelelő genomprojektek során került felszínre. Így a sep10p

```

osep10 1 -----MEPEAMPAPDPNDARQRFLLLELEFVQCLANPTYTH-YLAQNRYFED
asep10 1 MASPEEMGDDASEIPSPPKNTYKDPDGGQRFLLELEFVQCLANPTYTH-YLAQNRYFED
msep10 1 -----MAAAVAMEIDDAGNRLRFQLELEFVQCLANPNYLN-FLAQRGYFKD
hsoh1 1 -----MAAAVAMEIDDAGNRLRFQLELEFVQCLANPNYLN-FLAQRGYFKD
dsep10 1 -----MAKMYGKGKTAIESELEQRRRQLELEFVQCLANPNYLN-FLAQRGFYFKD
csep10 1 -----MESVSEKTRFVEVECFEVOALANPNYLN-FLAQRGYFKE
sep10 1 -----METKWLKSKVPDDKSRFETLELEFVQMLSNPWYLN-FLAQHKYFED
SOH1 1 -----MSSTNGNAPATPSSDQONPLPTRFEVELEFVQSLANIQYVTYLLTQQQIWKSS

osep10 46 EAFICGYLKYLYWQRPEYIKYIMYPHCLFFLELLQANFRNAWAHPASKEVAHRQQYFFW
asep10 60 EAFICGYLKYLYWQRPEYIKYIMYPHCLFFLELLQNPFRNATAHPANKELAHRQQFYFW
msep10 46 KAFVNYLKYLYWKEPEYAKYLYKYPQCLHMLELLQYEHFRKELVNAQCAKFIDEQQILHW
hsoh1 46 KAFVNYLKYLYWKEPEYAKYLYKYPQCLHMLELLQYEHFRKELVNAQCAKFIDEQQILHW
dsep10 50 QSFINYLYKYLYWKEPEYAKYLYMYPMCLFFLELLQYEHFRREIVNSQCKKFIDQAILQW
csep10 39 EYFVNYLYKYLYWKEPEYAKYLYKYPQCLHMLELLQSQQFRDSMAYGCSAKFVEDQVVLQW
sep10 45 EAFLOYLEYMBYWRPEYVKFITYPTICLHMLTLLKNPQFRNDISRADLSKQVNDIYYEW
SOH1 52 PNFKNLYLYLYWYWCNPEYSCQIVYPCNCLFFLLKLLNG-----FVES---AIVNEDGLLEG

osep10 106 KNYRNNRLKHILPRPPPPTPAPAPAPAPATVPPAAPVPSTVVPVPAAPSSSLPMSAAG
asep10 120 KNYRNNRLKHILPRPLPEPVP-PQPPVAPSTSLPPAPSATAALSPALSPMQYNMMSKND
msep10 106 QHYSRKRVRLLQALAEQQQQNNTAGK-----
hsoh1 106 QHYSRKRMRLLQALAEQQQQNNTSGK-----
dsep10 109 QHYTRKRIKLIENTVAAQQQQQLQQQQQANGMEAATGGESAAPTNPVNGSASTADSQQ
csep10 99 QFYLRKRHRLLCMMPDGQEELEESEDEADIRQKDEDEDEETMKKPD-----ADTAEKNS
sep10 105 LGKGLQOYGSADDATLSQPQQEEDEKQVDVKKENE-----
SOH1 103 LDELPRITIQLQGPQWMNEMVERWAN-----

osep10 166 ASAMSPMQFAGTPTGTN-----IPKNDMRNVMGQGGRKRKMG-----
asep10 179 TRNMGATGIDRRKRKREAYLTQVTKMLETRYYSFRVIGRLWKL SYMVFNLC
msep10 -----
hsoh1 -----
dsep10 169 TSSALQPVAQPGNPQQQQQIN-----GVASGANIKLELN-----
csep10 154 TTSTVSKKEK-----
sep10 -----
SOH1 -----

```

16.ábra A sep10p proteinnel homológiát mutató proteinek többszörös illesztése. Fekete színnel vannak jelölve azok az aminosavak, amelyek az illesztett proteinek adott pozíciójában legalább 50%-ban azonosak. Szürke színnel vannak jelölve a kisebb mértékben azonos, illetve hasonló tulajdonságú aminosavak. osep10 (*O. sativa* AAG60189), asep10 (*A. thaliana* NP197491), msep10 (*M. musculus* BAB24169), hsoh1 (*H. sapiens* NP057144), dsep10 (*D. melanogaster* AAF52111), csep10 (*C. elegans* T21674), SOH1 (*S. cerevisiae*, NP\_011388). A fajnevek utáni számok az adatbázisokban használatos hozzáférési számokat jelölik.

proteinnel homológiát mutató ismert proteinek: a *Saccharomyces cerevisiae* Soh1p proteinje (Fan és Klein, 1994) (46% azonosság), amely egy transzkripció regulátor, továbbá egy emberi fehérje (hso1, 50% azonosság), amely az SMCC-nek nevezett transzkripció komplexben található (Gu és mtsi, 1999), amely a *Saccharomyces cerevisiae* Mediátor komplexének funkcionális homológja. A további öt nagyfokú homológiát mutató nem karakterizált protein a *Cenorhabditis elegans* (45% azonosság), *Drosophila melanogaster* (43% azonosság), *Mus musculus* (51% azonosság), *Oryza sativa* (45% azonosság) és *Arabidopsis thaliana* (49% azonosság) genom projektjei alapján kerültek elő.

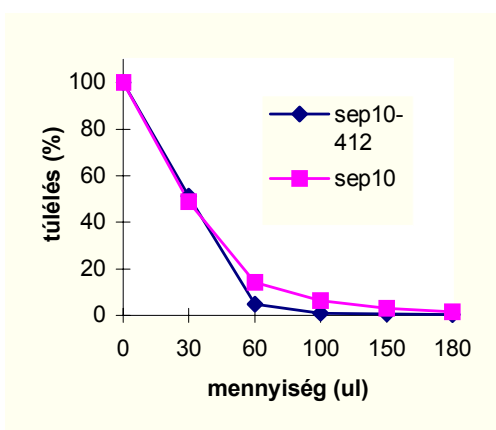
Ezek a proteinek több mint 40%-nyi azonosságot és több mint 70%-os hasonlóságot mutattak az aminosav szekvenciájukban. Azonban ez a nagyfokú homológia nem oszlott meg a proteinek teljesen hosszán, hanem különálló doménszerű struktúrákba tömörült, így nagyjából a sep10p protein első két harmadát lefedve. Ezen szekvencia elemzésekből tehát azt találtuk, hogy a sep10p protein egy intron nélküli gén terméke, egy kisméretű, evolúciósan konzervált protein, amely erős homológokkal rendelkezik számos élőlényből. Továbbá, a nagyfokú homológiák felvetették a lehetőségét annak, hogy a sep10p az SOH1 valamint hsoh1 proteinekhez hasonló funkcióval is rendelkezhet. Ez alátámaszthatja a *sep10* mutációja során megfigyelhető komplex fenotípust. A sep10p és homológ proteinjeinek többszörös szekvencia illesztése a 16. ábrán látható.

### 5.1.3 A *sep10-412* mutáns nem érzékeny mutagénekre

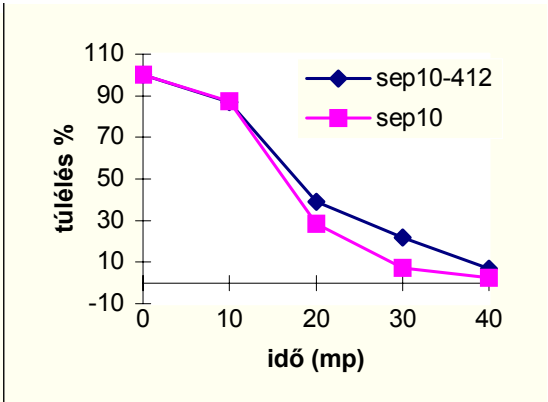
A sep10p protein nagyfokú homológiát mutat két ismert proteinhez, a *Saccharomyces cerevisiae* SOH1 proteinjéhez, illetve az emberben izolált SMCC transzkripció komplex egyik alegységéhez (hsoh1). Az SOH1 proteint kódoló gént egy mutációjakor elsősorban hiperrekombinációt okozó gén (a *HPRI*) mutációja következtében kialakuló hőmérsékletérzékenység szupresszoraként izolálták (Fan és Klein, 1994). A további vizsgálatok kimutatták (Fan és mtsi, 1996), hogy több más hasonló génnel együtt transzkripció folyamatokban vehet részt. Továbbá, kölcsönhat a DNS javítási mechanizmusokban szerepet játszó Rad51p-el, így feltehetően a DNS repair-ban is lehet szerepe. Azonban nem mutat érzékenységet különböző mutagén kezelésekre (pl. UV) (Fan és mtsi, 1996). Annak eldöntésére, hogy a sep10p-nek lehet-e hasonló funkciója, mint az SOH1-nek, megvizsgáltuk, hogy a *S. pombe* sejtek érzéke-



nyebbek-e fizikai (UV) illetve kémiai (nitrozoguanidin) mutagenézisre, ha a *sep10* gén nem működőképes. Ezért a 2-511 *sep10-412 ura4-D18 h<sup>90</sup>* illetve kontrollként a 0-221 *ura4-D18 h<sup>90</sup>* törzseket UV és nitrozoguanidin kezelésnek vetettük alá. A kezelés kivitelezésének részletei a 4.7 pontban olvashatóak. Az eredmények a 16. és 17. ábrákon láthatóak. Az eredmények alapján elmondható, hogy a *sep10-412* mutáció nem befolyásolja a sejtek érzékenységét UV és nitrozoguanidine kezelésre.



16. ábra *sep10-412* sejtek nitrozoguanidin érzékenysége kontrolhoz viszonyítva. Az ábrán látható, hogy nem figyelhető meg szignifikáns különbség a túlélés között.



17. ábra *sep10-412* sejtek UV érzékenysége kontrolhoz viszonyítva. Az ábra alapján nem állapítható meg lényeges különbség a sejtek UV érzékenysége között.

#### 5.1.4 A *sep10* mutációja nem növeli az *ade6* allélok közötti mitotikus rekombináció mértékét

Az SOH1 protein transzkripciószabályozó, amely kölcsönhatást mutat a transzkripcióhoz kapcsolt rekombinációs folyamatokban szerepet játszó HPR1-gyel, továbbá az SOH1 gén mutációja növeli az intrakromoszómális mitotikus rekombináció gyakoriságát. Ezért az SOH1 proteinnél feltételezzük, hogy a transzkripcióhoz kapcsolt rekombinációs folyamatokban játszhat szerepet (Fan és Klein, 1994, 1996). Annak eldöntésére, hogy a *sep10p*-nek lehet-e hasonló szerepe, mint az SOH1 proteinnak, azaz a *sep10-412* mutációnak van-e fent említett hatása, meghatároztuk az intrakromoszómális mitotikus rekombináció mértékét *sep10<sup>+</sup>* és *sep10-412* sejtekben.

A tesztrendszer (amely logikáját tekintve megfelel annak, amelyet az SOH1 esetében alkalmaztak), amivel az intrakromoszómális mitotikus rekombináció mérhető, egy olyan törzset alkalmaz, amelybe egy plazmidkonstrukció van integrálva a kromoszómális *ade6* lókuszbá. Ennek részletei a 4.6 pontban olvashatóak.

Az általunk létrehozott 2-841 *sep10-412 ade6-M210* int::pUC *ura4<sup>+</sup>* ::*ade6-M26 ura4-D18 leu1-32 lys1-131 h<sup>r</sup>* törzs, illetve kontrollként a 3-62 törzs felhasználásával a 4.6 pontban leírt módon elvégeztük a rekombinációs gyakoriság mérését. Az eredmény (6. táblázat) azt mutatja, hogy a *sep10-412* mutációnak nincs hatása az *ade6* allélok közötti intrakromoszómális rekombináció gyakoriságára.

6.táblázat A kromoszómális és integrált *ade6* allélok közötti mitotikus rekombináció mértéke *sep10* valamint *sep10-412* sejtekben. Nem figyelhető meg lényeges eltérés a rekombinációs gyakoriságokban.

Törzs	Telepek száma	Ade <sup>+</sup> rekombinánsok száma (x 10 <sup>-4</sup> )
<i>sep10</i>	5	55.9
<i>sep10-412</i>	4	50.9

### 5.1.5 A *sep10* gén megszakítása diploid sejtben

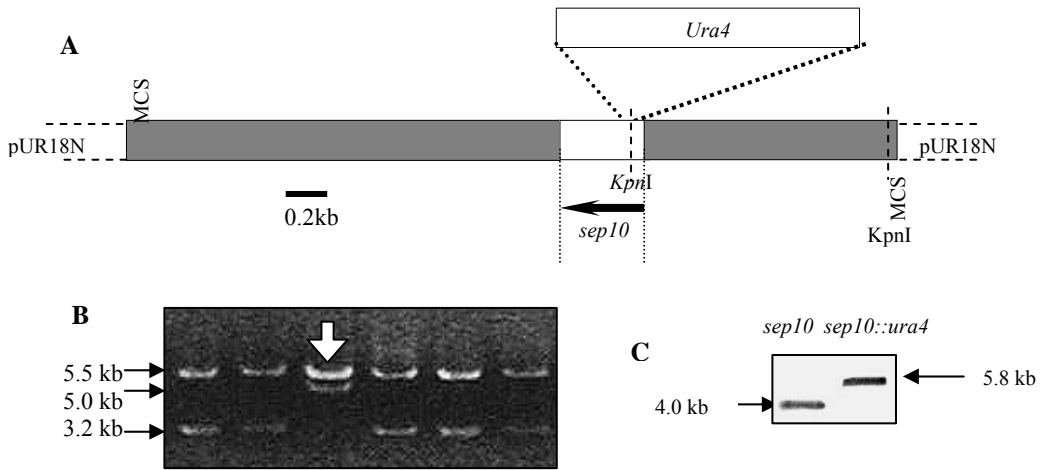
Az eddigi eredmények alapján feltételeztük, hogy a *sep10* gén terméke valószínűleg transzkripciós szintű regulációs funkciót láthat el a citokinezis és az ivari differenciálódás során. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a *sep10* mennyire játszik esszenciális szerepet a sejtciklusban, elvégeztük a gén teljes inaktiválását, azaz elkészítettük a gén megszakításos allélját, az élesztőkutatóban leggyakrabban használt egylépéses gén megszakításos (one-step gene disruption) módszert használva (Rothstein, 1983). Ennek során a gén kódoló régiójába egy marker gént helyezünk, majd a lineáris konstrukciót homológ rekombináció segítségével integráljuk vad típusú sejt genomjába, a megfelelő gén helyére. A kialakuló megszakításos allélt tartalmazó mutánsokra a marker gén alapján szelektálunk.

Ennek megfelelően az S10-5 szubklónban elhelyezkedő *sep10* gén kódoló régiójának *KpnI* restrikciós hasítóhelyére, amely szerencsésen a 93. bázisnál hasítja a DNS-t (15. ábra), az *ura4* marker gént helyeztük be (18.A ábra). Ehhez azonban első lépésként az S10-5

szubklón MCS szakaszából kellett eltávolítottuk a *KpnI* hasítóhelyet, melynek jelenléte nem tette lehetővé a konstrukció létrehozását. Az S10-5 plazmidot *SmaI* és *EcoRI* restrikciós hasítóenzimekkel emésztettük, amelyek vágóhelyei közrefogják a *KpnI* felismerő szekvenciát. Az emésztett plazmid ragadós végeit feltöltöttük, majd a plazmidot összeligáltuk és baktériumba transzformáltuk. A kinövő telepek sejtjeiből preparált plazmidok szerkezetét *KpnI* emésztésével ellenőriztük. Egy megfelelő plazmidot *KpnI*-gyel emésztettük, majd ragadós végeit feltöltöttük és ligáltuk a pUD18 (Barbet és mtsi, 1992) plazmidból előzetesen *AccIII* restrikciós endonukleáz segítségével kivágott és végeiben feltöltött, az *ura4* gént tartalmazó 1,8 kb nagyságú DNS fragmenttel, majd a ligátumot baktériumsejtekbe transzformáltuk. A bakteriális sejtekből preparált plazmidok szerkezetét *PstI*-*BamHI* emésztéssel ellenőriztük (18.B ábra). Az *ura4* gént hordozó plazmidot PCR reakcióban templátként használva, a *sep10::ura4* konstrukciót az SZS1 és SZS2 (lásd 4.4) primerek segítségével felszaporítottuk, majd a tisztított PCR terméket a 4.4.2 pontban leírtak szerint a protoplaszt fúzióval létrehozott D1 diploid törzsbe transzformáltuk. A megjelenő néhány transzformánst EMMA minimál táptalajra izoláltuk, majd MSA spóráztató táptalajra replikáztuk és a kialakuló azigotikus aszkuszokat tetrád analízisnek vetettük alá, amelynek során mikromanipulátorral elválasztottuk egymástól az aszkuszból kiszabaduló spórákat. A csészéket 25°C-on inkubáltuk. Az inkubálás után minden diploid transzformáns esetén mind a négy spóra képes volt telep képzésére, amely telepek auxotrófiájának vizsgálata 2:2  $ura^+ : ura^-$  szegregációt mutatott, jelezve, hogy a diploid sejt egyik kromoszómája tartalmazta a megszakításos allélt.

Az ily módon azonosított, feltételezett megszakításos konstrukciót tartalmazó  $ura^+$  szegregánsok mikroszkópos vizsgálata *sep^-* fenotípust mutatott, amely megerősítette, hogy a sejtekben a megszakításos konstrukció homológ rekombinációval beintegrálódott a kromoszómába. Néhány mutánsból genomiális DNS-t is izoláltunk, majd Southern blottal bizonyítottuk (részletek a 4.4-ben), hogy valóban hordozzák a megszakításos allélt (18.C ábra).

Az ellenőrzött, *sep10::ura4* konstrukciót tartalmazó izolátumok közül egyet, a 2-921 *sep10::ura4 ura4-D18 ade6-M26 leu1-32 h<sup>90</sup>* genotípusú törzset használtuk a későbbi vizsgálatokhoz, amibe több különböző markert vittünk, protoplaszt fúzió segítségével, így előállítva a 2-923 *sep10::ura4 ura4-D18 lys1-131 h<sup>90</sup>* és 2-924 *sep10::ura4 ura4-D18 lys1-131 leu1-32 h<sup>90</sup>* törzseket.



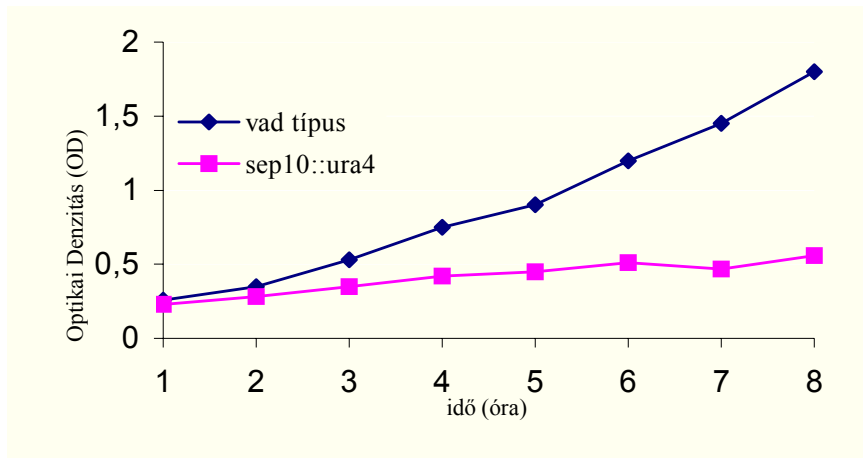
18. ábra A. A megszakításos allél készítése, *ura4*-t tartalmazó DNS fragment *sep10* ORF-be történő építésével. B. Az *ura4*-t tartalmazó DNS szakasz helyes beépülésének ellenőrzése plazmidizlátumok *PstI-BamHI* emésztésével. A *PstI-BamHI* dupla emésztés eltávolítja az S10-5-ben elhelyezkedő fragmentet (lásd 12. ábra), így a méretkülönbség egyértelmű jele az *ura4* beépülésének. Az ábrán a pozitív plazmidklónt nyíllal jelöltük. C. A megszakításos konstrukció helyes integrációjának ellenőrzése Southern blottal. Az ábrán példaként egy *sep10::ura4*-t tüntettünk fel.

### 5.1.6 A *sep10* gén megszakítása kondicionálisan letális

A *sep10* gén megszakítása a *sep10-412* mutánshoz hasonló fenotípust eredményezett. A sejtekben elmaradt a citokinézis, ami hosszabb-rövidebb láncok kialakulását okozta. A sejtek ezt a fenotípust 25 illetve 30 °C-on mutatták. Továbbá, a *sep10-412* mutánsokhoz hasonlóan a *sep10::ura4*<sup>+</sup> sejtek sem voltak képesek konjugációra, sem önmagukkal, sem h<sup>+</sup> és h<sup>-</sup> párosodási típusú vad sejtekkel. Érdekes módon a teljesen inaktivált *sep10* gént tartalmazó *sep10::ura4* sejtek a *sep10-412* mutánsokhoz hasonlóan hőmérsékletérzékeny növekedést mutattak, azaz 35 °C-on nem képeztek telepet. Annak vizsgálatára, hogy a hőmérséklet 35 °C-ra emelése milyen módon inaktiválja a *sep10::ura4*<sup>+</sup> sejteket, a következő kísérletet végeztük el.

A 2-921 *sep10::ura4 ura4-D18 ade6-M26 leu1-32* h<sup>90</sup> illetve kontrollként a 0-1 L972 vad típusú törzs sejteit YEL tápfolyadékban 25 °C-on log fázisig (OD~0.2) tenyésztettük, majd a sejteket restriktív (35 °C) hőmérsékletre helyeztük és óránkénti mintákból optikai denzitást mértünk. A kísérlet eredménye a 19. ábrán látható. Az eredmények azt mutatták, hogy a hőmérséklet nagyjából 4 óra elteltével leállította a növekedést. 4 óra elteltével a *sep10::ura4*

tenyészet egy részét visszahelyeztük 25°C-ra, azonban a növekedés egy napi inkubálás után sem indult meg, jelezve, hogy a sejtek a hőmérsékletemelkedés hatására elpusztultak.



19. ábra A *sep10::ura4* sejtek szaporodása 35 °C-on kontrollhoz viszonyítva. Az optikai denzitás értékeiből látható, hogy a sejtek lassú szaporodása a 4 óránál leáll.

## 5.2 A *sep11* gén klónozása

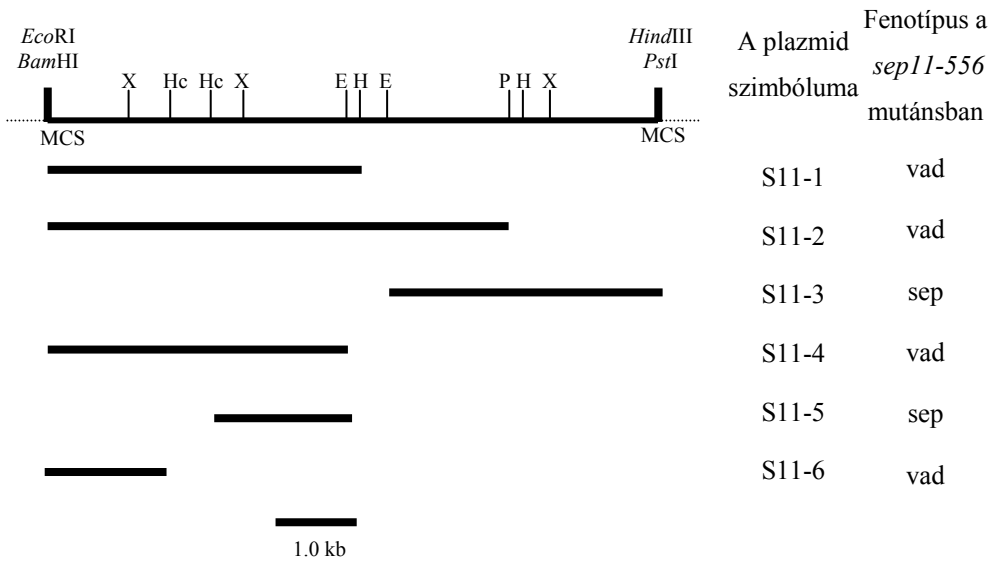
### 5.2.1 A *sep11* gén klónozása genomialis könyvtárból

A *sep11* gén klónozásához a *sep10* gén klónozásához használt módszert használtuk, felhasználva azt, hogy a *sep11-556* mutáns sejtek a *sep10-412* sejtekhez hasonlóan hőmérsékletérzékeny növekedést mutatnak és ugyancsak sterilek (Grallert és mtsi, 1999).

Ennek érdekében a 2-928 *sep11-556 ura4-D18 h<sup>90</sup>* törzs sejtjeit a *sep10* gén klónozásához is használt PSP1 genomialis könyvtárral (Barbet és mtsi, 1992) a 4.4.2-ben leírtak szerint transzformáltuk. A transzformáció után a sejteket szelektív táptalajra (EMMA) szélesztettük, és a csészéket a *sep11-556* mutánsnak restriktív hőmérsékletre (35°C) helyeztük, illetve egy csészét transzformációs kontrollnak használtunk, ezért azt 30 °C-on inkubáltuk. Többszöri transzformálás után számos restriktív hőmérsékleten növekedő telepet kaptunk, amelyeket a 4.4.3 pontban leírt plazmidstabilitási teszttel vizsgáltunk. A transzformált sejtek spórázókéességét mikroszkóp alatt vizsgáltuk, és azon izolátumokból, amelyek esetén a plazmid elvesztése együttjárt a *sep* fenotípus megjelenésével, és a spórázókéesség elvesztésével, a plazmidot izoláltuk, majd visszatranszformáltuk a 2-928 *sep11-556 ura4-D18 h<sup>90</sup>* törzs sejtjeibe, hogy a komplementációt ellenőrizzük.

A fenti kísérletsorozat eredményeképpen két olyan plazmidot sikerült izolálnunk, amelyek minden követelménynek megfeleltek. A restriktív enzimekkel történő elemzés megmutatta, hogy a plazmidok 7.5 kb illetve 8.6 kb genomialis inzerteket tartalmaztak. A restriktív térképezés rámutatott arra is, hogy a plazmidok átfedő genomialis szegmenseket tartalmaztak. A kisebb inzertet hordozó plazmidot S11-0-nak neveztünk el. Elvégeztük a szubklónozását, az egyes szubgenomialis fragmenteket pUR18N plazmid megfelelő restriktív hasítóhelyeire építettük, majd a szubklónokat komplementációs tesztek céljából *sep11-556* sejtekbe transzformáltuk. A szubklónok jellemzői és a komplementációs vizsgálatok eredményei a 20. ábrán láthatóak.

A szub-genomialis fragmenteket tartalmazó plazmidok komplementációs vizsgálata megmutatta, hogy a komplementáló gén az S11-4 illetve a később előállított (lásd 5.2.3) S11-6-os szubklónokban megtalálható szub-genomialis fragmenteken található.



20. ábra A *sep11-556* mutációt komplementáló genom fragment szubklónozása pUR18N-ben és a szubklónok komplementációjának vizsgálata. *H* *HindIII*, *E* *EcoRI*, *P* *PstI*, *Hc* *HincII*, *X* *XhoI*, *MCS* Multiple cloning site.

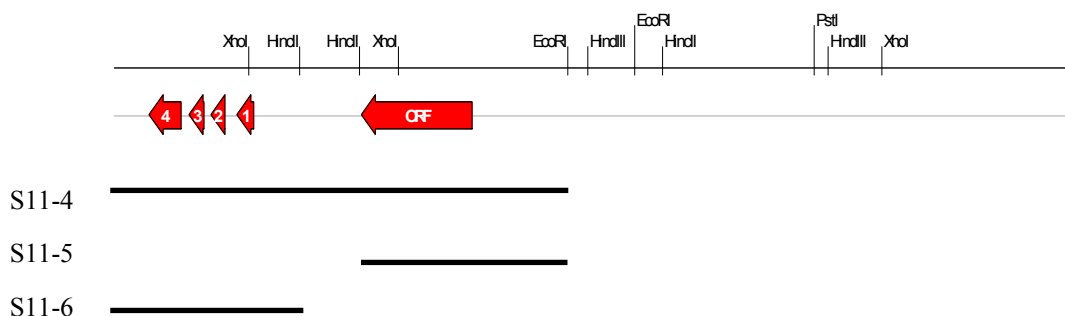
### 5.2.2 Az S11-4-es szubklón a *sep11* gént tartalmazza

Hasonlóan a *sep10* gén klónozásához, a *sep11* esetében is szükséges volt eldönteni azt, hogy a vizsgálatok során a *sep11* gént, vagy egy extragenikus szupresszort sikerült klónozni.

Ehhez a 5.1.1 pontban leírt módszerrel elméletileg megegyező megközelítést: a klónozott genomális fragment mutáns genomba történő integrálását és az integránsok genetikai vizsgálatát alkalmaztuk. Ennek érdekében az S11-4 szubklónból a komplementáló 3.5 kb-nyi DNS fragmentet a pJK148 integratív plazmid (Keeney és Boeke, 1994) *EcoRI* helyére klónoztuk, majd a konstrukcióval (neve: S11-pJK) és a pJK148 kontroll plazmiddal a 2-927 *sep11-556 leu1-32* h<sup>90</sup> törzs sejtjeit a 4.4.2-ban leírtak szerint transzformáltuk. A transzformánsokra EMMA szelektív táptalajon szelektáltunk. A megjelenő prototróf telepek a kontroll esetén *sep*, míg az S11-pJK-val transzformált sejtek esetén vad fenotípust mutattak. Az utóbbi transzformánsok közül néhányat izoláltunk és velük a 4.4.3 pontban leírt plazmid stabilitási tesztet végeztük el, amely eredménye megmutatta, hogy a sejtek a plazmidot stabilan tartal-

mazzak, következésképpen az beintegrálódott a genomba, a 13. ábrán a *sep10* esetében leírt sémát követve. Néhány integránst hagyományos módon kereszteztünk a 0-38 *leu1-32* h<sup>-</sup> törzssel. Mivel az eredeti *sep11-556* mutációt tartalmazó törzs (2-927) h<sup>90</sup> párosodási típusú, így annak érdekében, hogy elkerüljük az egy genomon belüli párosodást, a

fent leírt keresztezésekből izoláltunk vad típusú leucin auxotrófiát nem tartalmazó h<sup>-</sup> pároso-



21. ábra A *sep11* gént tartalmazó 7.5 kb-os DNS fragmentum restriktions térképe, valamint az S11-4 szubklón genomiális fragmentjén megtalálható két ORF pozícióinak rekonstruálása a régió genomiális szekvenciája alapján az OMIGA szekvencia elemző szoftver segítségével. Az ábrán fel van tüntetve az S11-4, S11-5, S11-6-os szubklónok elhelyezkedése a fragmentumhoz viszonyítva. A gén előrejelző algoritmus szerint 4 exonból álló, és a *sep11*-nek megfelelő SPAC5D6.05 gén exonjai 1,2,3,4-gyel jelölve.

dási típusú sejteket, tudván azt, hogy ezek a sejtek tartalmazzák a beintegrált konstrukciót. Az izolált sejteket ezután hagyományos módon kereszteztük 0-39 *leu1-32* h<sup>+</sup> törzssel, ezekben a keresztezésekben már biztosítva a különböző genomok közötti párosodást. A szóban forgó keresztezésekből izolált ~50 db spóra fenotípusának vizsgálata minden esetben 1:1 leu<sup>+</sup>: leu<sup>-</sup> eloszlást mutatott és nem produkált *sep* fenotípusú sejteket, megmutatva azt, hogy az S11-pJK plazmid a *sep11* gént tartalmazta.



### 5.2.3 A *sep11* gén egy 3 intront tartalmazó, homológiai nélküli proteint kódol

A *S. pombe* genomjának szekvenciája rendelkezésre áll, sőt a *sep11* klónozásának idejében is már a genom szekvenciájának több mint 90%-a hozzáférhető volt az interneten ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_Pombe](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_Pombe)). Így valószínűnek tűnt, hogy a *sep11* gént tartalmazó genomiális inzert szekvenciája is megtalálható az adatbázisban. Ezért az S11-4-es szubklón szekvenciájának egy részét a pUR18N plazmid szekvenciájához kapcsolódó univerzális primer felhasználásával meghatároztuk, majd ezt a szekvenciát használtuk a *S. pombe*

#### B.

```

sep11cDNS 1 ATGCAAGAAGTGTATCTTTTAGGAGTAGTCCCCTCGAGGCGTTTTGAAGCAGTTGTAATTCCTTTATCAAAAACGTTGGATGGTCCGAAAACAATATTGGAGTTTTGGGT
sep11gDNS 1 ATGCAAGAAGTGTATCTTTTAGGAGTAGTCCCCTCGAGGCGTTTTGAAGCAGTTGTAATTCCTTTATCAAAAACGTTGGATGGTCCGAAAACAATATTGGAGTTTTGGGT

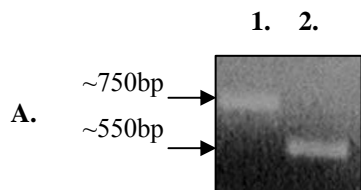
sep11cDNS 111 AGTTTACCGTCTAAAG-----
sep11gDNS 111 AGTTTACCGTCTAAAGGTATGTCGTGAAAAATGCATATGAGGTCATCACAGTCCTTATTTAGATTTTAAATCAGTTATTTCAAGGATGTAATAAGAACTAACTTT

sep11cDNS 128 -----ATGTTCTCTCTAACTTGCCCTAGACAGCCCGATTCTTGGTTGAGATTGTGCAGCAATATTAGTCTCATGATGAGACTGATACTGAATGGTCTAAAAATACT
sep11gDNS 221 GAATGGAAGATGTTCTCTCTAACTTGCCCTAGACAGCCCGATTCTTGGTTGAGATTGTGCAGCAATATTAGTCTCATGATGAGACTGATACTGAATGGTCTAAAAATACT

sep11cDNS 229 CAATGGT-----CAATGTACTTAGAAGGGAAGTCTAGAACCGAAACGTTGAAGATAAATGGGT
sep11gDNS 331 CAATGGTTGTAAATTTGCATATAAAATATACGTCCTCTTAGGCATACATAATTAGTCAGTCAATGTACTTAGAAGGGAAGTCTAGAACCGAAACGTTGAAGATAAATGGGT

sep11cDNS 286 ATCAGACCAGTAAACAGAGCGAAACTTACCAATGGTCTGTAACTGAGTTTGTGCGAAAAAATGGGTTATGAGT-----
sep11gDNS 441 ATCAGACCAGTAAACAGAGCGAAACTTACCAATGGTCTGTAACTGAGTTTGTGCGAAAAAATGGGTTATGAGTATGGTCCGATAATATTTCCACACTATTCATTTTAAAC

```



22. ábra A. PCR segítségével genomiális DNS-ről (0-1 L972 h<sup>-1</sup> kontrol, 1-sel jelölve), valamint cDNS könyvtár-ból (2-sel jelölve) a 23. ábrán látható szekvenciákhoz hibridizáló, a 5 pontban leírt primerek felhasználásával felszaporított *sep11* DNS fragmentek. A DNS méreteknél jelentkező különbség megfelel az intronok méreteinek. B. A *sep11* részleges ORF genomiális DNS (gDNS) és cDNS szekvenciáinak összehasonlítása. Az ábra az ORF azon részének szekvenciáját mutatja, amelyet a cDNS klónozáshoz használt és a 5 pontban említett primerek segítségével felerősítésre került. Látható, hogy az illesztés eredményeképpen azonosíthatóak az intron szekvenciák. Az illesztés módszerei a 5- pontban találhatóak.

genomszekvenciájával történő összehasonlításhoz. Az összehasonlítás egy megegyező szekvenciát adott, amely az 1. kromoszóma egy darabjának szekvenciáját tartalmazó SPAC5D6 nevű kozmid szekvenciájának egy részével volt azonos. A régió szekvenciájának analízise segítségével rekonstruáltuk az általunk klónozott 7.5 kb genomiális fragment restriktív térképét (21. ábra). Az adatbázisban a régió szekvenciája alapján bioinformatikai módszerekkel

előjelzett lehetséges gének (ORF-ek) pozícióit is meghatároztuk (21. ábra). Ez alapján az S11-4 szubklónban lévő genomiális régió két teljes ORF-et tartalmazott. Ezért, annak eldöntésére, hogy melyik előjelzett ORF a *sep11* gén, előállítottuk az S11-5 illetve S11-6-os szubklónokat, amelyek külön-külön tartalmaztak egy-egy ORF-et (21. ábra). Ezen szubklónok komplementációs vizsgálata (20. ábra) megmutatta, hogy a *sep11* gén az S11-6-os szubklónon elhelyezkedő SPAC5D6.05 előjelzett ORF. Az adatbázis gén előrejelző algoritmus a *sep11* gén szerkezetében három intron előfordulását jelezte. Annak érdekében,

```

1  aattttccct tactactgac attgcattgt atattttggt cactatttct acaaccatca
61  gtagcttagc ttttagtagac gottaaagaga taaaagaaat caatttcggt gaggtgogat
121 gctatgcaag aactgtatct tttaggagta gtcccctcga ggcgttttga agcagttgta
      M Q E L Y L L G V V P S R R F E A V V
181 aattctttat caaaaacggt ggatggtcgg aaaacaatat tggagtttg ggtagtttac
      N S L S K T L D G P K T I L E F W V V Y
241 cgtcctaaag gtafgtcgtg aaaaatgcat atgtaggctg catcacagtc cttatttaga
      R P K
301 ttttaaatca gttatttcaa gcatgtaaaa tgaactaac tttgaattga agatgttctc
      D V P
361 ctaactttgc ctagacagcc cgattcttgg ttgagattgt gcagcaatat tgagttctcat
      P N L P R Q P D S W L R L C S N I E S H
421 gatgagactg atactgaatg gtctaaaaat actcaatggt ttgtaaat gcatataaat
      D E T D T E W S K N T Q W
481 atacgctctcc ttaggcatac taattagtc ggtcaatgta cttagaaggg aactcagaac
      S M Y L E G N S E
541 cgaacgctga agataaatgt ggtatcagac cagtaaacag agcgaactt accaatgggt
      P K R E D K C G I R P V N R A K L T N G
601 ctgtaactga gatttgctgaa aaaatggggt atgagtatgg tccacataat ttttcacact
      S V T E F V E K M G Y E
661 attcattttt aactaatctt tcaacaggtt ttctcatgag tacattatc aggacttga
      F S H E Y I I Q G L E
721 atatttttct tttgatacga ctgtacgtat atatcaaaac ttgacccct gcgacgagcg
      Y F F F D T T V R I Y Q T L I P S Q Q R
781 atcaataaaa ccaccgtttc atcctatgaa cgaagaacag ccatggattt tacacgtcta
      S I K P P F H P M N E E Q P W I L H V Y
841 tacacatggt gctgatgcaa gtaatcaagt agcgatggcc aaagcagaag ccaatttaac
      T H V A D A S N Q V A M A K A E A N L T
901 aaaagtcaaa actctctcat cagcattttg tgatttaaaa aacgctcagat tgtaaaaaag
      K V K T L L S A F C D L K N V R L
961 gaattttgat acatttacaat aaattcgcta caaatactgc aatgataatg ccaataaat
1021 gaaagactta agggcgatcc taataatggt ttgcgcttag tgattgaata actaaaaagt
1081 tttacttttg tttcaatgaa gtggtacata tagtatatga tttcattag gatcaactgt
1141 aaattatgaa ggaacaatca attaagctaa acatttatgt caggattagt accctggtg

```

23. ábra A *sep11* gén szerkezete és a lefordított *sep11p* protein szekvenciája. Az intronok szekvenciája duplán aláhúzva. A gén megszakításhoz használt *XhoI* vágóhely félkör. A cDNS klónozáshoz használt primerek (lásd 5) hibridizálási helyei aláhúzással jelölve.

hogy megismerjük a *sep11* gén pontos, kísérleti adatokon alapuló szerkezetét, elvégeztük a *sep11* cDNS klónozását. A *sep11* cDNS azon részét, amely az előrejelzés szerint közrefogta a genomiális DNS-ben még megtalálható intronokat, PCR segítségével cDNS könyvtárból felszaporítottuk. Ehhez a 23. ábrán látható és a 4.4 pontban feltüntetett primereket használtuk, amelyek a fenti logika szerint a feltételezett Exon I, illetve Exon IV szekvenciákhoz hibridizáltak. Mindkét primer tartalmazott *BamHI* vágóhelyeket az 5' szekvenciájukban, amely

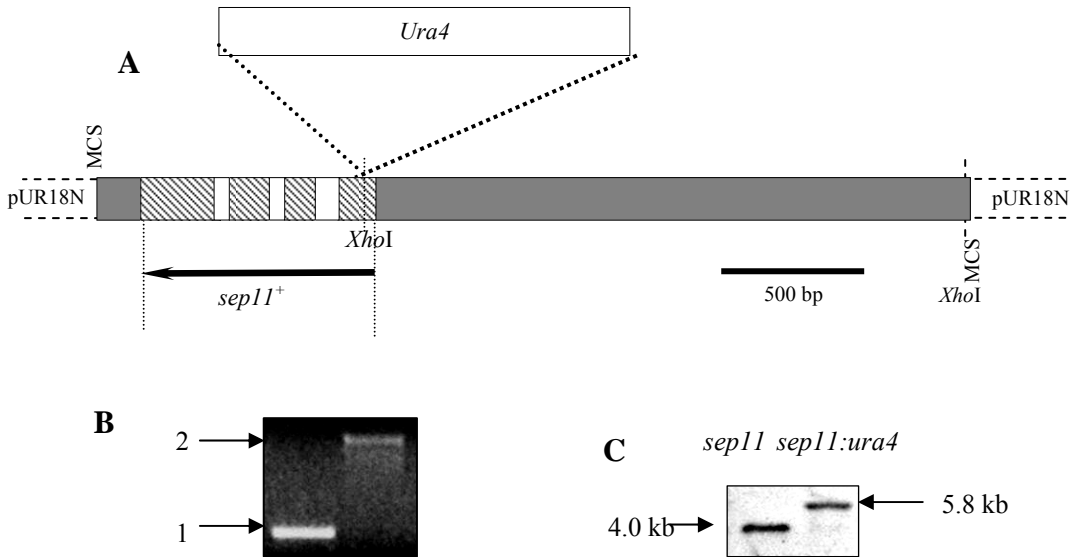
lehetővé tette a fragment klónozását pUR18N plazmidba. Egy ~550 bp-nyi DNS darabot sikerült felszaporítani PCR segítségével (22.A ábra), amelyet a pUR18N plazmid *Bam*HI hasítóhelyére klónoztunk. A fragment szekvenciáját mindkét szálon univerzális primerek segítségével meghatároztuk. A szekvenciákat, amelyek két végükön átfedő szakaszokat tartalmaztak, összeillesztettük, és összehasonlítottuk a *sep11* gén kódoló régiójának genomi DNS szekvenciájával (22.B ábra). Az illesztés eredményeképpen a cDNS szekvenciából hiányzó és a genomi DNS szekvenciában megtalálható szekvenciákat meghatároztuk, így megkaptuk az intronok szekvenciáit. A cDNS szekvenciát AJ313525 hozzáférési számon elküldtük a legfontosabb adatbázisokba. A részleges cDNS szekvencia adatbázissal való összehasonlítása megmutatta, hogy a *sep11* gén bioinformatikai módszerekkel előrejelzett szerkezete megfelel a kísérletesen meghatározott szerkezetnek. Ennek megfelelően a *sep11* gén három intront (intron I,II,III) tartalmaz. A gén szerkezete a 23. ábrán látható.

A *sep11* kódoló régiójáról lefordított sep11p protein egy 25.5 kDa elméleti molekula tömegű, 207 aminosavból álló protein. A sep11p szekvenciájának homológia vizsgálata nem mutatott homológiát az adatbázisokban szereplő más proteinnel, jelezve azt, hogy a sep11p feltehetően egy specifikus *S. pombe* protein.

#### 5.2.4 A *sep11* gén megszakítása kondicionálisan letális

A *sep11* gén sejten belüli funkciójának vizsgálatához a gént teljesen inaktiváltuk, a kódoló régió megszakításával. Ehhez a *sep10* gén esetében használt egy lépéses gén megszakítási módszert alkalmaztunk, az *ura4* marker gént illesztettük a *sep11* gén kódoló régiójába (24.A ábra), az *Xho*I helyre, amely a *sep11* gént a 33. bázisnál hasítja (23. ábra). Az *ura4* marker gén beillesztéséhez első lépésként az *Xho*I hasítóhelyet távolítottuk el a pUR18N plazmidból, majd a keletkező pUR18N-*Xho*I plazmid *Eco*RI-*Hind*III helyeire klónoztuk az S11-6-os szubklónból a *sep11* gént tartalmazó 1,6 kb-nyi fragmentet. A kialakult plazmidnak az S11-6-*Xho*I nevet adtuk. Ezután a pUD18 plazmidból *Acc*III enzimmel kihalított 1.8 kb-nyi, az *ura4* gént tartalmazó DNS szakaszt a két végén T4 DNS polimeráz segítségével feltöltöttük, majd ligálással az S11-6-*Xho*I plazmid *Xho*I-gyel hasított és ugyancsak T4 polimerázzal feltöltött végeihez illesztettük. A ligátumot baktériumba transzformáltuk. A baktériumtelepekből készített minipreparátumokban *Eco*RI-*Hind*III emésztéssel ellenőriztük a *sep11::ura4* jelenlétét, az 5.1.5 pontban a *sep10* esetén leírt módon a kivágott fragmentek méreteinek összehasonlításával. A megfelelő konstrukciót tartalmazó plazmidot templátként használtuk PCR

reakcióban, amelynek során felszaporítottuk a *sep11::ura4* konstrukciót (24.B ábra). Ezután a 2,6 kb-nyi fragmentet a 0-221 *ura4-D18* h<sup>90</sup> törzs sejtjeibe transzformáltuk, lehetővé téve, hogy homológ rekombinációval a *sep11::ura4* konstrukció lecserélje a kromoszómális *sep11* gént. A megfelelő rekombináns transzformánsokra az ura<sup>+</sup> marker alapján minimál táptalajon (EMMA) szelektáltunk. A megjelenő telepeket izoláltuk, amelyek *sep* fenotípust mutattak, megerősítve ezzel a megfelelő rekombináció lejátszódását. Ez az eredmény azt is jelezte,



24.ábra A. Az *ura4*<sup>+</sup> marker gén *sep11* *XhoI* helyére történő beépítésének sémája. Az exonok áthúzással jelölve. B. A *sep11::ura4* konstrukció megfelelő S11-6-*XhoI* plazmidről (2-essel jelölve) és kontrollként *sep11* ORF S11-6 plazmidről (1-essel jelölve) PCR-rel történő felszaporításának eredménye. Primerként a 5-ben feltüntetett SZS3 és SZS5 primereket használtam. C: A *sep11* gén inaktiválásának ellenőrzése Southern blottal.

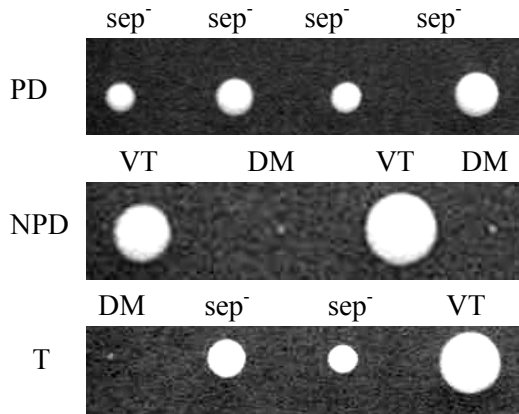
hogy a *sep11* gén teljes inaktiválása feltehetően nem letális a sejtekre. Genomiális DNS-t izoláltunk a feltételezett *sep11::ura4* illetve vad típusú sejtekből, és a gén inaktiválását Southern blottal ellenőriztük (24.C ábra).

A 2-897 *sep11::ura4*<sup>+</sup> *ura4-D18* h<sup>90</sup> sejtek a *sep11-556* mutációt hordozó sejtekhez hasonló fenotípust mutattak, a citokinetikus problémák miatt láncos növekedést produkáltak, illetve nem voltak képesek ivari differenciálódásra sem önmagukkal, sem h<sup>+</sup> illetve h<sup>-</sup> párosodási típusú sejtekkel. Továbbá, a *sep10* megszakításánál megfigyeltékhez hasonlóan (5.1.6)

hőmérsékletérzékeny növekedést mutattak, azaz 35 °C-on nem voltak képesek telepek képzésére.

### 5.2.5 A *sep10* és *sep11* együttes inaktivációja letális

A klónozott gének mutációi által okozott mutáns fenotípusok hasonlósága arra engedett következtetni, hogy a gének hasonló folyamatokban vehetnek részt. Így megvizsgáltuk azt, hogy milyen hatással van a sejtekre mindkét gén teljes inaktiválása. Ehhez a két gén megszakításos konstrukcióját egy sejtbe helyeztük a két eltérő genom kombinációjával, azaz a *sep10::ura4* illetve *sep11::ura4* konstrukciókat tartalmazó sejtek keresztezésével és a megfelelő dupla megszakítást tartalmazó sejtek izolálásával. Mivel mindkét gén megszakítása sterilítással jár, ezért a keresztezés csak protoplaszt fúzió technikájával lehetséges, amelyhez szükséges két eltérő markerű törzs (Sipiczki és Ferenczy, 1977). Ehhez a 2-897 *sep11::ura4 ura4-D18* h<sup>90</sup> sejtekbe egy *leu1-32* mutációt vittünk be. Ennek érdekében a 2-897 törzs sejtjeit transzformáltuk a *sep11* gént tartalmazó S11-6 plazmiddal, majd a csészéket 35 °C-on inkubáltuk. Ilyen körülmények között csak a transzformánsok képeztek telepet. Mivel ezek a transzformánsok vad fenotípust mutattak, ezért egy transzformánst hagyományos módon kereszteztünk a 0-220 *leu1-32 ura4-D18* h<sup>90</sup> törzs sejtjeivel. A keletkező spórákat YEA táptalajra szélesztettük, és a kinövő telepek között *sep* fenotípusú és leucin auxotrófiát tartalmazó izolátumokra szelektáltunk. Így izoláltuk a 2-896 *sep11::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32* h<sup>90</sup> törzset. Ezután a 2-896, valamint a 2-923 *sep10::ura4 ura4-D18 lys1-131* h<sup>90</sup> törzsek sejtjeit protoplaszt fúzióval kereszteztük. A létrejövő diploid sejtekből képzett telepeket SMA táptalajra izoláltuk, majd MSA spóráztató táptalajra replikáltuk. A kialakuló aszkuszokból a spórákat mikromanipulációval elválasztottuk, és a csészéket 25 °C-on inkubáltuk. 4 napos inkubálás után a kialakuló tetrádokat elemeztük. A fenotípus vizsgálata megmutatta, hogy azokban a tetrádokban (NPD, T), amelyekben rekombináns spórák keletkeztek, a *sep10::ura4* és *sep11::ura4* konstrukciót együttesen hordozó spórák nem tudtak telepeket képezni. Csupán 30-50 életképtelen sejtből álló mikrokolóniákat képeztek, jelezve azt, hogy a két gén együttes inaktivációja 25 °C-on is letális. Az előforduló tetrádtípusok telep morfológiáját illetve a megfelelő fenotípusát a 25. ábra mutatja.



25. ábra A *sep10* és *sep11* gének együttes inaktiválásának vizsgálata során kapott tetrádtípusok (PD, NPD, T) egy-egy reprezentánsa, valamint az egyes spóráklónok fenotípusa mikroszkópos megfigyelés alapján. VT: vad típus, DM: dupla megszakítás, *sep<sup>-</sup>*:*sep* morfológiájú sejtek. PD: szülői típus, NPD: nem szülői típus, T: tetrád típus

### 5.3 A *ste11* expressziójának vizsgálata a *sep10*<sup>-</sup> és *sep11*<sup>-</sup> mutánsokban

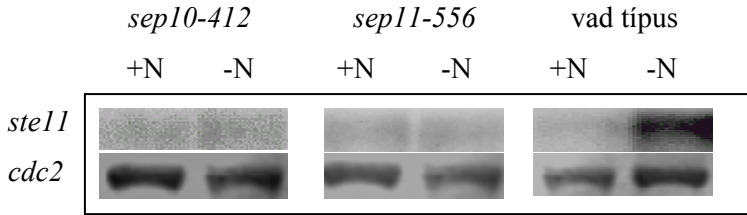
#### 5.3.1 A *ste11* gén transzkripciójának indukciója elmarad mindkét mutánsban

A *sep10-412* és a *sep11-556* mutánsok a citokinetikus defektus mellett nem tudják végrehajtani az ivari differenciálódást sem. Korábbi vizsgálatok (Grallert és mtsi, 1999) kimutatták, hogy a mutánsok nem képesek a konjugációra, valamint a protoplaszt fúzióval előállított *sep10-412/sep10-412* és *sep11-556/sep11-556* homozigóta diploidok képesek ugyan meiózusra, de a *sep10-412* esetén 15%, míg a *sep11-556* esetén csupán 2%-os hatékonysággal, továbbá a meiotikus termékek abnormálisak.

A doktori munka során további vizsgálatokat végeztünk a sterilitás okainak feltárására, különös tekintettel arra, hogy az eddig ismertett eredmények alapján feltételezhető, hogy a *sep10* és *sep11* gének transzkripciós szintű folyamatokban játszhatnak szerepet, így szerepük lehet bizonyos ivari differenciálódási gének transzkripciós szabályozásában. Az egyik valószínűsíthető target gén a *ste11* lehet, amely az ivari differenciálódás során elsőként aktiválódó kulcsfontosságú transzkripciós regulátor, amelynek hiányában a sejtek között nincs konjugáció (lásd 3.5). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a *sep10-412* illetve *sep11-556* mutációk hatását a *ste11* transzkripciójának indukciójára, a következő kísérleteket végeztük el.

0-221 *ura4-D18 h*<sup>90</sup>, 2-511 *sep10-412 ura4-D18 h*<sup>90</sup> valamint 2-928 *sep11-556 ura4-D18 h*<sup>90</sup> sejteket 100 ml MSL+uracil tápfolyadékban a log fázis felső határáig ( $6\text{-}8\cdot 10^6$  sejt/ml) tenyésztettünk, majd mindegyik tenyészetből 30-30 ml-t centrifugálás után ugyanannyi MSL, illetve MSL-N tápfolyadékban szuszpendáltunk, majd 4 órán keresztül 30°C-on ráztattuk. A nitrogénmentes tápfolyadékban elindul a *ste11* indukciója (Yamamoto és mtsi, 1997), míg az MSL kontrollként szolgál.

4 óra elteltével a mintákból a 4.4.1 pontban leírt protokollt követve RNS-t izoláltunk. Az RNS mintákat a 4.4.1-ben leírt módon futtattuk és blottoltuk. Ezt követően a membránt hibridizáltattuk *ste11* és *cdc2* specifikus próbákkal, majd a hibridizációt detektáltuk a 4.4.1-ben leírtak szerint. A *cdc2* próba kontrollként szolgált, hiszen transzkripciója folyamatos a sejtben (MacNeill és Nurse, 1997). Az eredmény a 26. ábrán látható, amely megmutatta, hogy a *ste11* indukciója mind a *sep10-412* mind a *sep11-556* mutánsokban elmarad. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a *sep10* és *sep11* gének szükségesek a *ste11* normális működéséhez.



26. ábra. A *ste11* gén indukciójának vizsgálata *sep10-412* és *sep11-556* mutánsokban. +N: nitrogén jelenléte (MSL), -N: nitrogén hiánya (MSL-N). Kontrollként a folyamatos transzkripcióval rendelkező *cdc2* szolgál.

### 5.3.2 A *ste11p* protein túlermelletése szupresszálja a sterilitást a *sep10* azonban csak nagyon kismértékben a *sep11* sejtekben

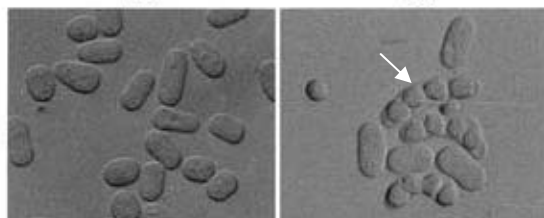
A 5.3.1 pontban leírtak alapján feltételezhetjük, hogy a *sep10* illetve *sep11* gének szerepet játszanak a kezdeti ivari differenciálódási folyamatokban, a *ste11* gén valószínűleg közvetett módon történő aktiválásával. Mivel a kezdeti ivari differenciálódási folyamatok vezetnek a konjugációhoz, ezért lehetséges, hogy a konjugáció elmaradásának hátterében a *ste11* gén transzkripciója indukciójának elmaradása, vagyis a megfelelő proteinszint hiánya állhat. Az elméleti megfontolások kísérletes vizsgálatára elvégeztük a *ste11p* túlermelletését a mutáns sejtekben, amely - abban az esetben, ha csupán a *ste11p* proteinszint hiánya okozta a konjugáció elmaradását - szupresszálni fogja a konjugációs defektust a mutánsokban.

A kísérlet során a *ste11p* protein túlermelletését a 4.9 illetve 4.10 pontokban ismertett plazmidkonstrukciók felhasználásával végeztük. A túlermeléshez a 3-580 *ste11::LEU2 leu1-32 ura4-D18 h<sup>90</sup>* törzset használtuk kontrollként, amely steril, azonban *ste11p* túlermelletés hatására az ivari differenciálódás elindul benne és normálisan végbemegy (Yamamoto és mtsi, 1997). Így a 3-580, a 2-511 *sep10-412 ura4-D18 h<sup>90</sup>* valamint a 2-897 *sep11-556 ura4-D18 h<sup>90</sup>* törzsek sejtjeit a 4.4.2 pontban leírtak szerint a PSK66 illetve kontrollként a pREP4 (*ura4* markerrel) plazmidokkal transzformáltuk. A sejteket tiamint tartalmazó szelektív (EMMA) táptalajra szélesztettük. A tiamin tartalom lehetővé tette, hogy a plazmidok *nmt*

**A.**

+T

-T



60

*ste11Δ* +pREP42 *ste11*



## B.

Transzformánsok	Az aszkuszok aránya (%) MSA+tiamin-on	Az aszkuszok aránya (%) MSA-n
<i>ste11</i> Δ pREP4	-	-
<i>ste11</i> Δ pREP42 <i>ste11</i>	-	32.2*
<i>sep10-412</i> pREP4	-	-
<i>sep10-412</i> pREP42 <i>ste11</i>	-	19.2*
<i>sep10::ura4<sup>+</sup></i> pREP3	-	-
<i>sep10::ura4<sup>+</sup></i> pREP41 <i>ste11</i>	-	31.5*
<i>sep11-556</i> pREP4	-	-
<i>sep11-556</i> pREP42 <i>ste11</i>	-	1.3*
<i>sep11::ura4<sup>+</sup></i> pREP3	-	-
<i>sep11::ura4<sup>+</sup></i> pREP41 <i>ste11</i>	-	1.25*

27. ábra A *ste11*p túlermeltetésének vizsgálata *sep10<sup>-</sup>* és *sep11<sup>-</sup>* sejtekben. A. A transzformált *ste11*Δ (nyíllal jelölve egy normális aszkusz), valamint *sep10-412* sejtek (nyíllal jelölve egy abnormális aszkusz) fenotípusa. A képek három nap inkubáció után készültek. +T: tiamin jelenléte, -T: tiamin hiánya. Méretvonal:5μm  
 B. Aszkuszok százalékos előfordulása a feltüntetett transzformánsokban. Az értékeket három napos inkubáció után határoztuk meg, majd további két napon keresztül figyeltük az esetleges számbeli változásokat, amelyet nem tapasztaltunk. \* 3-5 transzformáns adatainak átlaga.

promotere csendes maradjon. A táptalajokon megjelenő telepek közül néhányat EMMA+tiamin táptalajra izoláltunk, majd két napos 30 °C-on történő inkubálás után repli-

káztunk spóráztató táptalajokra (MSA), oly módon, hogy ugyanazt a csészét MSA+tiamin (represszív körülmények) illetve MSA (induktív körülmények) táptalajokra is átreplikáztuk. A csészéket 30 °C-on inkubáltuk. 3 nap után az aszkuszkok megjelenését mikroszkóp alatt vizsgáltuk és azok számát meghatároztuk, majd további 2 napig figyeltük az aszkuszkok számának esetleges változását. A megjelenő aszkuszkok fenotípusa a 27.A ábrán látható a *sep10-412* illetve a kontroll (*ste11Δ*) esetében. Az aszkuszkok előfordulásának aránya a 27.B ábrán látható. Az eredmények azt mutatták, hogy a *ste11p* protein túltermeltetése szupresszálta a sterilitást a *sep10-412*, de csak nagyon kismértékben (alig több mint 1%-ban) a *sep11-556* sejtekben. A *sep11-556* esetében megjelenő nagyon kis számú aszkusz mikroszkópos képe megegyezett a *sep10-412* esetében tapasztaltakkal.

Ugyanezt az eredményt kaptuk, amikor a 2-924 *sep10::ura4 ura4-D18 lys1-131 leu1-32 h<sup>90</sup>* és 2-896 *sep11::ura4 ura4-D18 leu1-32 h<sup>90</sup>* törzsek sejtjeit transzformáltuk PSK85 illetve kontrollként pREP3 (*LEU2* markerrel) és a fent leírt módon vizsgáltuk a *ste11p* túltermeltetését a megszakításos konstrukciót tartalmazó sejtekben. A megjelenő aszkuszkok aránya a 27B. ábrán látható.

A *sep10<sup>-</sup>*, illetve *sep11<sup>-</sup>* sejtekben történő *ste11p* túltermeltetés a *sep10-412/sep10-412*, illetve *sep11-556/sep11-556* homozigóta diploidok meiózisa esetén korábban megfigyeltékhez (Grallert és mtsi, 1999) hasonlóan abnormalis aszkuszkok megjelenését eredményezte (27.A ábra), jelezve, hogy a *sep10* és *sep11* gének termékei a *ste11* aktivációján kívül a meiózisban és/vagy a spóráképzésben is fontos szerepet játszanak.

## 6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A doktori munka során a *Schizosaccharomyces pombe sep10* és *sep11* génjeinek klónozását és jellemzését végeztük el. A *sep* géncsalád fent említett két tagja a mutációjuk esetén pleiotróp fenotípust mutató tizenegy *sep* gén közé tartozik. A gének mutációi elsősorban a citokinezis folyamatát érintik, de egyúttal blokkolják az ivari differenciálódást is (Grallert és mtsi, 1999). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a gének termékei feltehetően közvetett módon játszanak szerepet a citokinezis folyamatában és valószínűleg annak szabályozásában vehetnek részt.

A *sep10* és *sep11* gének klónozása és szekvenálása valamint szekvenciájuk analízise megmutatta, hogy a *sep10* egy intron nélküli gén, míg a *sep11* gén három intront tartalmaz. A *sep10p* protein nagyfokú homológiát mutat transzkripció szabályozásában szerepet játszó ismert proteinnel és számos nem jellemzett proteinnel, míg a *sep11p* protein feltehetőleg *S. pombe* specifikus protein lehet.

A *sep10p* nagyfokú homológiát mutat a *Saccharomyces cerevisiae* SOH1 proteinjével, amelyet kódoló gént a rekombinációban és transzkripcióban szerepet játszó *HPR1* gén szupresszoraként izolálták (Fan és Klein, 1994), majd később megmutatták, hogy transzkripciós regulátor szerepe van (Fan és Klein, 1996). Továbbá, a *sep10p* nagyfokú homológiát mutat a humán SMCC transzkripciós komplex hsoh1 alegységével is. Az SMCC komplex a *Saccharomyces cerevisiae* Mediátor komplexének funkcionális homológja. A fent említett nagyfokú szekvencia homológiák valószínűsítik, hogy a *sep10p* is szerepet játszhat transzkripciós folyamatokban. A *sep11p* nem mutat homológiát jellemzett illetve nem jellemzett proteinnel, így a szekvencia analízis nem szolgáltat információt a *sep11p* lehetséges szerepével kapcsolatban, azonban az eddigi eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a *sep10p*-hez hasonló folyamatokban lehet szerepe.

A proteint kódoló gének transzkripciójához az eukarióta sejtekben multiprotein komplexek koordinált működése szükséges, amelyek a target gének promoter és szabályozó régióiban szerelődnek funkcionális egységekké. A folyamat alapvető tartozékai a számos alegységből álló RNS polimeráz II, és az ahhoz asszociált általános transzkripciós faktorok (GTF, melyek a TFIIA, B, D, E, F, H). Jelenlétük szükséges és elégséges a promoter régiók felismeréséhez és az ún. bazális transzkripcióhoz (basal transcription) (Malik és Roeder, 2000). Így a bazális transzkripciós apparátus gyakorlatilag az összes gén transzkripciójához szükséges. A

gének transzkripciójának szabályozásához azonban a távolabbi enhancer, silencer régiókhoz asszociálódó specifikus transzkripciós faktorok is szükségesek, amelyek már csupán néhány gén transzkripciójának szabályozásáért felelnek. Az utóbbi évek kutatásai tovább bonyolították a fenti képet, megmutatva, hogy a specifikus faktoroktól a bazális transzkripciós apparátusra történő szignálok továbbításához, azaz a transzkripció szabályozásához ún. koaktivátorokra is szükség van, amelyek szükségesek több specifikus faktortól származó szignálok továbbításában, így kisebb-nagyobb géncsoportok transzkripciójának szabályozásában játszanak szerepet. Az egyik legismertebb ilyen koaktivátor a Mediátor komplex [lásd Malik és Roeder (2000) összefoglalóját].

Az elsőként a *Saccharomyces cerevisiae*-ben leírt Mediátor komplex (Flanagan és mtsi, 1991) tehát szükséges a gén specifikus transzkripciós faktorok és az RNS polimeráz II komplex közötti szignálok továbbításához, ebből következően a transzkripciós folyamatok szabályozásában játszik alapvető szerepet [lásd Myers és Kornberg (2000) összefoglalóját]. Az utóbbi évek kutatásai eredményeképpen magasabbrendű szervezetekben is leírták a *S. cerevisiae* Mediátor komplexének funkcionális homológjait [lásd Rachez és Freedman (2001) összefoglalóját], amelyek közé a fent említett SMCC komplex is tartozik. A jelenlegi eredmények alapján elmondható, hogy a Mediátor komplex egy a transzkripció szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszó, evolúciósan konzervált funkcionális és strukturális egység, amelynek összetétele részben ismert, azonban működésének mechanizmusa ismeretlen (Rachez és Freedman, 2001).

A *sep* géncsalád korábban jellemzett tagja, a *sep15*, melynek terméke a *Saccharomyces cerevisiae* Mediátor komplexének MED8 alegységével mutat homológiát. A *S. cerevisiae* Mediátor komplex számos alegységének homológjai detektálhatóak *S. pombe*-ban (Sipiczki, 2001), amely adatok valószínűsítik a Mediátor komplex létezését a *S. pombe*-ban is. A *sep15* és *sep10* mutánsok citokinezis-defektusa alapján felvetődik a lehetőség, hogy a komplex szerepet játszhat többek között citokinezishez szükséges gének transzkripciójának szabályozásában is. A *S. pombe* Mediátor komplex létezését kísérletes módszerekkel sikerült is a közelmúltban igazolni az RNS polimeráz II holoenzim komplex tisztítása kapcsán (Spahr és mtsi, 2000, 2001), ahol számos *S. cerevisiae* Mediátor alegység homológiát azonosítottak, köztük a *sep15p* proteint (Spahr és mtsi, 2001). *pmc6* néven azonosítottak egy olyan, más

fajok fehérjéihez nem hasonlító alegységet is, amelynek szekvenciája megegyezik a sep11p-nel.

Ez az eredmény és a korábban említett hasonlóság a sep10p és egy emberi Mediátor alegység (hsoh1) között alátámasztja elképzelésünket és összhangban van eredményeinkkel (Grallert és mtsi, 1999, Zilahi és mtsi, 2000a; valamint a doktori munkában ismertetett eredmények), miszerint a *sep11* géntermék a *sep10* géntermékkel valamint a korábban jellemzett *sep15* gén termékével szoros kölcsönhatásban fejtik ki funkciójukat. A szoros kölcsönhatás bizonyítéka, hogy a sep15p és sep11p proteinek a *S. pombe* Mediátor komplexének alegységei.

Érdekes módon azonban a sep10p nem található a Mediátor komplexben (Spahr és mtsi, 2000, 2001), ami jelentheti azt, hogy nem asszociálódik szorosan a komplexhez, így a tisztítás során elvész és nem detektálható. Lehetséges azonban egy olyan magyarázat is, miszerint a sep10p általánosabb funkciót tölt be a transzkripció szabályozásában. Következésképpen nemcsak a Mediátor komplexhez kapcsolódhat, hanem más szabályozó komplexekhez is. Ezt több adat támaszthatja alá. Egyrészt a sep10p humán homológja (hsoh1) része a humán Mediátor komplexnek (SMCC, Gu és mtsi, 1999). Másrészt azonban a *S. cerevisiae* homológja (SOH1) nem alegysége a *S. cerevisiae* Mediátor komplexnek, viszont az *SOH1* gén terméke genetikai kölcsönhatásban van a *HPR1* génnel, amelynek terméke egy a Mediátortól függetlenül létező transzkripciós komplex tagja (Chang és Jaehning, 1997). Továbbá az SOH1 protein az általános transzkripciós apparátus több tagjával is mutat kölcsönhatást (az RNS polimeráz II két alegységével valamint a TFIIB általános transzkripciós faktorról) (Fan és mtsi, 1996). Mindezek alapján feltételezzük, hogy az SOH1 proteinnek a Mediátor komplex és egyéb transzkripciós komplexek RNS polimerázhoz való kapcsolásában lehet szerepe, ami szükséges a gén vagy géncsoport specifikus transzkripciós faktoroktól származó szabályozási szignálok továbbításához (Gu és mtsi, 1999). Hasonló szerepet tulajdonítanak a hsoh1-nek is (Gu és mtsi, 1999), így feltételezhetjük, hogy a sep10p-nek is lehet ilyen szerepe.

A sep10p általánosabb szerepét alátámaszthatja az a tény is, hogy a sep10p nagyfokú homológiát mutat hipotetikus növényi (*O. sativa* osep10p és *A. Taliana* asep10p, 15.ábra) proteinekkel. A homológia mindenképpen szignifikánsnak tűnik, ami jelzi, hogy valóságos homológiáról lehet szó. Az irodalomban ezidáig nem ismertek a Mediátor komplex tagjainak növényi homológjai, ami felveti a lehetőségét annak, hogy a Mediátor komplex nem növényi

evolúciós „találmány” lehet. A *sep10p* esetén talált növényi homológok tehát tovább valószínűsítik, hogy a *sep10p*-nek általánosabb szerepe lehet a transzkripcióban és a növényi homológok talán a Mediátor-tól eltérő komplexek transzkripciós apparátusra történő asszociációjában játszhatnak szerepet. Ezt megerősítő vagy cáfoló kísérletes eredményt természetesen a megfelelő proteinek funkciójának részletes analízise szolgáltatathat. Mindent összevetve tehát bizonyos, hogy a *sep11p* a *S. pombe* Mediátor komplex tagjaként míg a *sep10p* feltehetően a Mediátor komplexhez is kapcsolódó, de annál szélesebb és általánosabb funkciót betöltve vesz részt a transzkripció szabályozásában. A kulcskérdés természetesen az, hogy az általuk szabályozott gének milyen folyamatokban vehetnek részt a sejtben?

Sokat segítené, ha ismernénk a Mediátor által szabályozott géneket más fajokban. Az eddig megismert Mediátor komplexek funkciójáról azonban sajnos kevés adat áll rendelkezésre. A legtöbbet a *S. cerevisiae* Mediátor alegységek mutációja során kialakuló defektusokról tudunk. A 20 alegységből álló *S. cerevisiae* Mediátor komplex több alegységének mutációi okoznak különböző fenotípusokat. Nagy részük letalitást okoz (Myers és Kornberg, 2000), jelezve, hogy a komplex esszenciális géncsoportok transzkripciójának szabályozásában is részt vesz. A letalítás viszont megnehezíti a genetikai alapú vizsgálatokat. A egyik nem esszenciális alegység a MED6. Mutációja hatására többek között lecsökken a párosodási feromonok transzkripciója, jelezve, hogy a *S. cerevisiae* Mediátor komplexnek is lehet szerepe ivari differenciálódási folyamatok szabályozásában (Myers és Kornberg, 2000). Természetesen valószínűsíthető, hogy amennyiben van is lényeges funkcionális hasonlóság a *S. pombe* és *S. cerevisiae* Mediátor egységek között, nem feltétlenül hasonló alegységek felelősek mindkét fajban a hasonló géncsoportok megfelelő transzkripciójának biztosításáért. Az emlősök Mediátor alegységeinek funkciójáról szintén nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Néhány alegység inaktivációja egerekben súlyos fejlődési rendellenességekhez, illetve embrionális letalitáshoz vezet, ami valószínűleg a sejtosztódási ciklus zavaraira vezethető vissza (Ito és Roeder, 2001). Ez az eredmény arra utal, hogy a Mediátor komplex emlősökben is részt vesz a sejtciklus szabályozásában. Következésképpen a *sep10*, *sep11*, *sep15* gének szerepe a sejtosztódás irányításában nem példanélküli kuriózum.

A *sep10* és *sep11* gének funkciójának elemzése is hozzájárul a Mediátor komplex funkcióinak megértéséhez. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a *sep10p* más folyamatokban játszhat szerepet, mint az SOH1 protein. A *sep10* gén mutációja zavarokat okoz a citokinezisben és az

ivari differenciálódásban (Grallert és mtsi, 1999). Az SOH1 gén mutációja nem okoz különösebb problémákat a sejt életében, viszont fokozza a mitotikus rekombináció mértékét (Fan és mtsi, 1994). A *sep10* mutációja ezzel szemben nem befolyásolja a mitotikus rekombinációt. Az SOH1 protein kölcsönhat a DNS javító mechanizmusokban szerepet játszó proteinekkel (Fan és mtsi 1996). Munkánk ugyan nem terjedt ki hasonló kölcsönhatások vizsgálatára, de megállapítottuk, hogy a *sep10-412* mutáció nem növeli a sejtek érzékenységét mutagén hatásokra.

A *sep11p* esetén a homológok hiánya megakadályozza a funkciót érintő további spekulációkat, azonban az a tény hogy a *sep15p*-hez hasonlóan a *S. pombe* Mediátor komplex tagja, valamint mutációja a *sep15* valamint a *sep10* mutációjához hasonló fenotípust okoz, felveti a lehetőségét annak, hogy a *sep11p*, *sep15p* géntermékek a Mediátor komplex részeként, valamint a *sep10p* azzal (is) kölcsönhatásban a citokinezis és az ivari differenciálódás folyamatainak szabályozásában is részt vehet.

A *sep10* és *sep11* gének külön-külön történő inaktivációja életképes mutánsokat eredményezett, ami jelzi, hogy sem a *sep10p* sem a *sep11p* nem fejtenek ki esszenciális funkciót a sejtben. Hozzá kell tenni, hogy az SOH1 gén inaktivációja sem jár letalitással (Fan és mtsi, 1994). Érdekes módon a *sep15* gén teljes inaktiválása letalitást okoz a *S. pombe* sejtekben (Zilahi és mtsi, 2000) hasonlóan *S. cerevisiae* homológjának (MED8) inaktivációjához (Myers és Kornberg, 2000). Ez a genetikai eredmény jelzi, hogy a Mediátor komplexben résztvevő *sep15p* és *sep11p* némileg eltérő folyamatokban is résztvehetnek, ami összhangban van azzal az elképzeléssel miszerint a Mediátor komplex egyes részei funkcionális alegységként működhetnek (Hampsey és Reinberg, 1999) és eltérő specifikus transzkripciós faktorokkal hathatnak kölcsön.

Mindazonáltal úgy a *sep11* mint a *sep10* gén inaktivációja magasabb hőmérsékleten már letalitást okoz, ami jelzi, hogy mindkét gén olyan gének transzkripciójára is hat, amelyek esszenciálisak magasabb hőmérsékleten. Továbbá lehetséges, hogy a target gének termékei csak magasabb hőmérsékleten válnak esszenciálissá. A gének együttes inaktiválásakor az egyszeres mutánsoknak megfelelő permisszív hőmérsékleten is kialakuló letalítás viszont arra utal, hogy a *sep11p* és *sep10p* által szabályozott géncsoportok transzkripciójának szimultán elmaradása már alacsonyabb hőmérsékleten sem tolerálható a sejt számára. Ez a funkcionális

átfedés a szakirodalom szerint jellemző a Mediátor komplex és az általános transzkripciós apparátus tagjaira (Malik és Roeder, 2000).

A funkcionális átfedésre utal az is, hogy mindkét gén mutációja okoz sterilitást. Mindkét gén mutációja az ivari differenciálódás központi pozitív regulátora, a *ste11* gén transzkripciója aktiválásának elmaradását okozza, ismételten alátámasztva azt a fenti hangsúlyozott elképzelést, miszerint a *sep10p* és *sep11p* transzkripciós regulátorokként működnek. A *ste11* gén aktivációjának elmaradása mindkét mutánsban jelzi, hogy a két géntermék hasonló formában feltehetően közvetve befolyásolja a differenciálódási folyamatokat, így egyik target génjük bizonyosan a *ste11*. Azonban a két *sep* gén mutációi és azok teljes inaktivációja eltérően engedi az ivari differenciálódási folyamatok végrehajtását a *ste11p* protein túltermelésekor. A *sep10<sup>-</sup>* sejtekben a *ste11p* túltermelése lehetővé teszi a konjugáció és valószínűleg a meiózis folyamatának helyes végrehajtását, megmutatva, hogy a *sep10<sup>-</sup>* sejtek esetében korábban tapasztalt konjugációs defektus (Grallert és mtsi, 1999) hátterében a *ste11* gén aktivációjának elmaradása áll. A *sep11<sup>-</sup>* sejtekben azonban a *ste11p* túltermelése nem képes a konjugáció helyreállítására. Ez azt jelzi, hogy ugyan mind a *sep10*, mind pedig a *sep11* génnek van hatása a *ste11* gén aktivációjára, a *sep11p*-nek feltehetőleg a *ste11p* funkciójának kifejtéséhez szükséges egyéb géntermékek génjeinek transzkripciójában és/vagy a *ste11*-től függetlenül, ahhoz képest időben később működő gének szabályozásában is lehet szerepe.

A *sep10* gén esetén a *ste11p* túltermelése ugyan teljes mértékben visszaállítja a konjugációs képességet, azonban csak abnormális aszkuszok kialakulását teszi lehetővé. Ugyanez figyelhető meg a *sep11* esetében is, de csak nagyon kis mértékben. Ez jelzi, hogy mind a *sep10p*, mind a *sep11p* proteineknek a *ste11* gén aktivációján kívül szerepük lehet a meiózis illetve az azt követő spóráképzéshez szükséges gének aktivációjában is. A spóráképzés génjeinek szabályozásáról a *S. pombe*-ban még nagyon keveset tudunk.

Összeségében elmondhatjuk, hogy jelenleg a *sep15* (Zilahi és mtsi, 2000a) és a doktori munka részét képező *sep10* és *sep11* gének az első három gén *S. pombe*-ban, amelyek lehetővé teszik a Mediátor komplex és a *sep10* esetében annál szélesebb funkcióval rendelkező transzkripciós komplexek feladatainak vizsgálatát. Részletes tanulmányozásuk hozzájárulhat a citokinezis valamint az ivari differenciálódás szabályozási folyamatainak jobb megértéséhez. A *S. pombe* genomjának teljes szekvenciája ma már rendelkezésre áll (Wood és mtsi, 2002), így az egész genomot felölelő expressziós vizsgálatokra alkalmas DNS chipek is ha-



marosan hozzáférhetővé válhatnak, ami természetesen megnyitja az utat a transzkripciós regulátorok target génjeinek kereséséhez és azok funkciójának feltárásához. Reményeinek szerint a közeljövőben módunk lesz arra, hogy ezzel a módszerrel megkeressük a dolgozatban leírt két gén által szabályozott géneket.

Az eredmények azt is megmutatták, hogy az eddig jellemzett *sep* gének egy kölcsönható szabályozási hálózat elemei lehetnek, így további *sep* gének klónozása, valamint a már ismert *sep* gének közötti kölcsönhatások vizsgálata hozzájárulhat a feltételezett szabályozási hálózat további megismeréséhez, és ezen keresztül a citokinezis szabályozásának jobb megértéséhez.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Eukarióta sejtekben a sejtosztódás folyamatainak összehangolását és helyes végrehajtását a sejtciklus eseményei irányítják. A benne szerepet játszó gének mutációi a sejtfolymatokat károsodásához vezetnek, ami emberben rákos daganatok kialakulását eredményezheti. Ezért a sejtciklus folyamatainak megértése a biológiai kutatások egyik fontos problematikája volt és ma is az. Az utóbbi években jelentős lépések történtek a sejtciklus egyes részfolymatainak megismerésére - így a G2/M átmenet szabályozásának kulcsfontosságú molekulái mára ismertté váltak. Azonban a sejtciklusban szerepet játszó gének sokaságáról és szabályozási hálózataik szerepéről kevés ismerettel rendelkezünk.

A sejtciklus eseményei konzervatív módon játszódnak le, és az eddigi eredmények azt sugallják, hogy azok szabályozása is hasonló sémát követ az eukarióta fajokban. Ezért a sejtciklus kutatások során fontos szerepet kapnak a modellszervezetek. Az egyik jelentős modell a sejtciklus kutatásában az egyszerű eukarióta *Schizosaccharomyces pombe*, amely számos előnyös tulajdonsága miatt alkalmas a sejtciklus egyes eseményeinek legfőképpen genetikai jellegű megközelítésére. Ennek megfelelően a *S. pombe* kiváló modellszervezetnek bizonyult a sejtciklus utolsó eseményének, a citokinezisnek a vizsgálatára is. A *S. pombe* sejtek citokinezise hasonló az állati sejtek citokineziséhez, azonban a növényi sejtekre jellemző vonásokat is hordoz. A citokinezis során a sejt közepén mediális gyűrű képződik, majd a mitózis után a gyűrű összehúzódik, lefűzve a citoplazmát, ezzel elválasztva két leánysejtet. Ezután a lefűzés helyére sejtanyagot tartalmazó elsődleges szeptum, annak két oldalára pedig másodlagos szeptumok szintetizálódnak. A tényleges szétválás feltehetőleg az elsődleges szeptum feloldásával történik. Számos gént azonosítottak, amelyek valamilyen szerepet játszanak a citokinezis folymatában, így a mediális gyűrű felépítésében és a szeptum szintézisének iniciációjában, azonban a szeptum feloldásának folymatáról és annak szabályozásáról keveset tudunk.

A Debreceni Egyetem Genetikai és Molekuláris Biológiai tanszékének munkatársai izoláltak szeptum feloldásában sérült mutánsokat, amelyeket *sep* (separation) mutánsoknak neveztek el. A mutánsok egy nagy csoportjának genetikai és citológiai vizsgálata megmutatta, hogy a gének mutációi közvetett módon hatnak a citokinezisre és egyéb sejtfolymatokat, mint az ivari differenciálódás is érintenek, jelezve, hogy a géntermékek egy széleskörű szabályozási

hálózat elemei lehetnek. Ennek megfelelően a már molekuláris módszerekkel is jellemzett *sep15* gén transzkripciósz regulátor funkcióval rendelkező proteint kódol.

A doktori munkában bemutatott kutatás során két további *sep* gén, a *sep10* és *sep11* gének molekuláris jellemzését végeztük el, a gének klónozásán és funkcióinak elemzésén keresztül. A *sep10* gén klónozása és szekvenálása és a szekvencia homológia vizsgálata megmutatta, hogy a *sep10p* egy konzervatív, feltehetően transzkripcióban szerepet játszó proteint kódol, amelynek *Homo sapiens* homológja (hsoh1 protein) egy az eukariótákban a közelmúltban felismert Mediátor komplex tagja, és *S. cerevisiae* homológja (SOH1 protein) a Mediátor komplex-szel kölcsönható általánosabb transzkripciósz regulátor szerepet betöltő molekula. A *sep11* gén klónozása és szekvenálása megmutatta, hogy a gén három intront tartalmaz, és a *sep11p* nem mutat homológiát jellemzett vagy nem jellemzett proteinekkal.

A Mediátor komplex szükséges a szabályozott transzkripcióhoz, rajta keresztül kerülnek a szabályozási szignálok (aktiváció, represszió) a gén vagy géncsoport specifikus transzkripciósz faktorokról a transzkripciósz végző általános transzkripciósz apparátusra. Ennek tükrében érthető a *sep10* illetve *sep11* gének mutációja esetén megfigyelhető sokrétű fenotípus. A Mediátor komplex-et *S. pombe*-ban is sikerült biokémiai módszerekkel tisztítani. Az identifikált alegységek között megtalálható a korábban leírt *sep15p* valamint a homológiát nem mutató *sep11p* is. Ez az eredmény alátámasztja a *sep10* és *sep11* gének mutációja során kialakuló fenotípusos hasonlóságokat, vagyis a *sep11p* kölcsönhatásban a *sep10p* proteinnel feltehetően a citokinezis és az ivari differenciálódás transzkripciósz szintű szabályozásában vesz részt.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a *sep10* gén terméke nagy bizonyossággal más típusú szabályozási folyamatokban játszik szerepet, mint az SOH1, hiszen a *sep10* mutációja az SOH1-től eltérően nem növeli a mitotikus rekombináció mértékét, és nem mutat érzékenységet mutagén kezelésekre, így feltehetően nem vesz részt az SOH1-ről feltételezett transzkripciószhoz kapcsolt rekombinációs, illetve DNS javítási folyamatokban.

Elvégeztük a *sep10* és *sep11* gének teljes inaktivációját, ami kimutatta, hogy a gének nem esszenciálisak a sejt számára, azonban magasabb hőmérsékleten már szükségesek, ami jelzi, hogy feltehetően olyan gének transzkripciószjában játszhatnak szerepet, amelyek csak magasabb hőmérsékleten létfontosságúak a sejt számára. Ha a sejtben mindkét gént teljesen inaktíváljuk, akkor az letalitást okoz alacsony hőmérsékleten is, jelezve, hogy a *sep10* és

*sep11* géntermékek által szabályozott géncsoportok együttes inaktiválása már halálos. Ezek a géncsoportok valószínűleg átfedik egymást.

A *sep10* és *sep11* gének ivari differenciálódásban játszott szerepével kapcsolatban kiderült, hogy mindkét gén szükséges a *stell* által kódolt pozitív differenciálódási regulátor működéséhez, így a *stell* a *sep10* és *sep11* gének egyik lehetséges targetje. A *stellp* túltermelése azonban csak *sep10<sup>-</sup>* esetben állította vissza a helyes differenciálódási folyamatokat, *sep11<sup>-</sup>* esetben nem, jelezve, hogy a *sep11p* a *stell* gén aktivációján kívül egyéb módon is befolyásolja *stellp* vagy targetjei működését.

A doktori értékezésben összefoglalt eredmények kimutatták, hogy a *sep10* és *sep11* gének nagy valószínűséggel transzkripciósz regulátor proteinek kódolnak, szerepük van a citokinezis illetve egyes ivari differenciálódási folyamatok szabályozásában, valamint egyik lehetséges target génjük a *stell*. A további kutatómunka célkitűzései között a *sep10p* és *sep11p* szerepének további vizsgálata szerepel, újabb target gének megismerésével. A *sep* géncsalád további tagjainak molekuláris elemzése is hozzájárulhat a sejtfolyamatokban szerepet játszó és az eddigi eredmények alapján szorosan együttműködő *sep* génekből álló szabályozási hálózat megismeréséhez.

## 8. SUMMARY

Cell division in eukaryotic cells is accomplished and maintained by a series of tightly regulated events, the cell cycle, which is believed to express its activity through several hundreds of genes and subsequent proteins and their interacting regulatory networks. Mutations of genes implicated in cell cycle result in impairment of correct progression of cell division, thus can lead to cancer in humans. Therefore understanding the processes and control of cell cycle has been a major task for biological research to solve.

In the past thirty years, considerable advances have been made to reveal the key processes of cell cycle, leading to the recognition of pivotal molecules that control G1/S and G2/M progression. These achievements were honoured by the Nobel price in 2001. In spite of that discovery, little is known about the myriad of genes required for cell cycle and about their interactions.

The above discovery has pointed out that events and key molecules in cell cycle are conservative, and acting in a similar manner in a broad spectrum of species. Consequently, model systems applied extensively in biology are also important for cell cycle research. Yeasts have been emerged as key model organisms for studying the processes and control of cell cycle, and enormously contributed to the above-mentioned exploration.

One of the two major yeast models is *Schizosaccharomyces pombe*, which is highly suitable to cell cycle research, mainly because of its mode of cell division and amenability to genetics, cell and molecular biology. *S. pombe* has also proved to be a good model for studying cytokinesis, the physical division of one cell into two, which is the last step in the cell division cycle.

Cytokinesis in *S. pombe* is executed analogically to mammalian cytokinesis, but it also has properties similar to those of plant cell division. As mitosis is initiated, a medial ring consisting of actin, myosin and a number of associated proteins is assembled at the midline. After mitosis is completed, the ring constricts and gradually pulls the cytoplasm toward the midpoint, physically separating the daughter cells. As the ring is constricting, a primary division septum containing cell wall material is synthesised to the space, appearing between the cells membrane and the cell wall. Later two lateral layers known as secondary septa are also added. The actual physical division is accomplished by the degradation of the primary septum. A considerable number of genes were identified to participate in the assembly of the

medial ring and in the initiation of septum formation, but little is known about the process and regulation of septum dissolution.

Mutants were isolated at the Department of Genetics and Molecular Biology, University of Debrecen, affecting the process of septum degradation. Since the mutants were cell separation defective, they were named *sep* (separation) mutants. The genetic analysis of the large number of mutants revealed 16 novel genes, implicated in the process of septum dissolution. The *sep* genes can be divided into a few subgroups. Subsequent genetic and cytological analysis of the mutant phenotype of a large subgroup containing eleven mutants revealed that they have impact on sexual differentiation besides cytokinesis and exhibit complex phenotypes. This finding indicated that the involvement of these genes in cytokinesis is indirect, and they might participate in a regulatory network affecting the control and execution of several important cell cycle events. Accordingly, the first gene cloned from the subgroup, *sep15*, turned out to encode a homologue of a subunit of the Mediator complex, which is involved in transcription regulation (see below). To further explore the function of the *sep* genes, this Ph.D research project was aimed to clone two other genes from the eleven, *sep10* and *sep11*, and characterise their roles and possible interactions.

Cloning and sequencing of *sep10* revealed that it encodes an intronless, conservative protein, which exhibits significant (more than 50% identity) sequence homology to known and unknown proteins from a wide variety of organisms, including yeast (*S. cerevisiae*), mouse and human. The two characterised homologous proteins are involved in transcription. The human homologue (hsoh1) is a subunit of a transcription complex called Mediator and the yeast homologue (SOH1) is also interacts with a transcription complex and exhibits transcription regulator activity. This finding is consistent with the anticipation that this subgroup of *sep* genes is possibly involved in a regulatory network, coupling gene regulation to the correct accomplishment of cytokinesis and other processes. Cloning of *sep11* disclosed that the gene has three introns and its putative product shows no homology to known or yet uncharacterised proteins, thus providing no information on its possible function. Nevertheless, the *sep11-556* mutant's phenotype and other experimental data suggest that it may have similar function to that of *sep10*.

The Mediator complex was first identified in *S. cerevisiae*, and is required for signal transfer from sequence specific transcription regulators to the basic transcription apparatus consist-

ing of RNA polymerase II and general transcription factors. This implies that its major role is to regulate transcription of subsets of genes, whose activation or repression signals depend on specific transcription activators or repressors.

Functional homologues of the *S. cerevisiae* Mediator were recently identified in mouse and human, indicating that this manner of gene regulation is much more conservative among species than previously anticipated. The Mediator complex was very recently identified also in *S. pombe*. Product of *sep15*, cloned earlier, was found as subunit of the complex, and *sep11p* was also recognised as subunit. This result confirmed the previous conception that the *sep* genes may participate in a regulatory network in the correct regulation of cytokinesis and sexual differentiation. Furthermore, it also favours that *sep11p* has transcriptional regulatory role possibly similar to that of *sep10p*.

During the Ph.D project, it was shown that processes, in which the *S. cerevisiae* homologue of *sep10*, SOH1 is involved, are most probably different from mechanisms that require *sep10p*. Unlike SOH1, mutation of *sep10* did not increase the mitotic recombination between direct repeats and did not show sensitivity to mutagenes, thus it is unlikely that *sep10* is involved in transcription-coupled recombination events and DNA repair, as is thought about SOH1, but suggests the involvement of *sep10p* in transcription regulation of cytokinesis and sexual differentiation.

Disruptions of both genes were also carried out, which resulted in no lethality, indicating that neither *sep10* nor *sep11* is essential for cell viability. Interestingly, the cells require *sep10* and *sep11* at higher temperatures, as the disruptants are unable to grow at higher temperatures, indicating that they may be implicated in regulation of genes that become essential at higher temperatures. Inactivation of both genes in the same cell was also accomplished, and resulted in lethality at all temperatures, suggesting that the simultaneous inadequate transcription of the sets of genes controlled by these genes can not be tolerated at any temperatures.

In studying the role of *sep10* and *sep11* in sexual differentiation, we obtained results suggesting that the major defect of sexual differentiation in *sep10* and *sep11* mutants is the omission of activation of the transcription of *ste11*, a positive regulator of differentiation, whose activation normally occurs after commitment to sexual development. This result suggested that both *sep10p* and *sep11p* participate in the correct activation of *ste11*. We also revealed that lack of *ste11* activation in *sep10* cells can be substituted by overproducing *ste11p*, indi-

cating that the possible major role of *sep10* in sexual differentiation is the indirect regulation of *ste11* activity. On the contrary, the overproduction of *ste11* has no suppression effect on defects of sexual differentiation in *sep11*, suggesting that *sep11p* performs roles not only in *ste11* activation, but possibly in other downstream processes in sexual development.

All above-mentioned results seem to corroborate the hypothesis that *sep10* and *sep11* encode transcription regulators. *sep11p* is part of the Mediator complex. Both proteins perform regulatory roles in cytokinesis and sexual differentiation. One of their target gene is *ste11*, whose transcription is influenced probably indirectly.

Further research is necessary to explore the roles of *sep10* and *sep11* in the regulation of cytokinesis and differentiation by identifying other target genes (utilizing the soon-available DNA microarrays). Cloning and characterisation of the hitherto uncloned *sep* genes and studying the genetic and biochemical interactions of *sep10* and *sep11* with the already cloned *sep15* would also contribute to a better understanding of the regulatory network that seems to control cell separation and sexual differentiation in *S. pombe*.



## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki a Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársainak, akik kisebb-nagyobb hozzájárulásukkal segítették munkámat. Külön köszönöm Dr. Sipiczki Máttyás témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított doktori munkám elvégzéséhez, valamint hasznos tanácsaival mindvégig segítette és irányította munkámat.

Köszönet illeti Dr. Grallert Ágnes, Dr. Miklós Ida, Dr. Benkő Zsigmond, valamint Dr. Zilahi Erika kollégákat, akik hasznos tanácsaikkal szintén elősegítették szakmai fejlődésemet.

Köszönöm a SOROS alapítványnak az általa megítélt rövidtávú szakmai tanulmányutat, amelynek segítségével két hónapot tölthettem a Koppenhágai Egyetem Molekuláris Biológiai Intézetében, ahol Dr. Olaf Nielsen irányítása mellett megismerhettem a transzkripció analízis alapjait, valamint elvégezhettem a *ste11*-el kapcsolatos kísérletek egy részét.

Végül, de nem utolsósorban nagyon köszönöm feleségem és családom támogatását, amely nagymértékben hozzájárult a doktori munka és a dolgozat elkészüléséhez.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

- Alfa C, Fantes P, Hyama J, McLeod M, Warbick E (1993) *Experiments with fission yeast: A laboratory course manual*. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Bahler J, Steever AB, Wheatley S, Wang Y, Pringle JR, Gould KL, McCollum D (1998) Role of polo kinase and mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. *J Cell Biol* 143:1603-1616
- Balasubramanian MK, Feoktistova A, McCollum D, Gould KL (1996) Fission yeast Sop2p: a novel and evolutionary conserved protein that interacts with Arp3p and modulates profilin function. *EMBO J* 15 6426-6437
- Balasubramanian MK, Helfman DM, Hemmingsen SM (1992) A new tropomyosin essential for cytokinesis in the fission yeast *S. pombe*. *Nature* 360:84-87
- Balasubramanian MK, Hirani BR, Burke JD, Gould KL (1994) *The Schizosaccharomyces pombe cdc3+* gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol* 125:1289-1301
- Balasubramanian MK, McCollum D, Chang L, Wong KC, Naqvi NI, He X, Sazer S, Gould KL (1998) Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics* 149(3):1265-75
- Balasubramanian MK, McCollum D, Surana U (2000) Tying the knot: linking cytokinesis to the nuclear cycle. *J Cell Sci* 113: 1503-1513
- Barbet N, Muriel WJ, Carr AM (1992) Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 114: 59-66
- Basi G, Schmid E, Maundrell K.(1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene*. Jan 15;123(1):131-6.
- Bezanilla M, Forsburg SL, Pollard TD (1997) Identification of a second myosin-II in *Schizosaccharomyces pombe*: Myp2p is conditionally required for cytokinesis. *Mol Biol Cell* 8:2693-2705
- Chang F, Drubin D, Nurse P (1997) cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* 137:169-182

- Chang F, Woollard A, Nurse P (1996) Isolation and characterisation of fission yeast mutants defective in the assembly and placement of the contractile actin ring. *J Cell Sci* 109:131-142
- Chang L, Gould KL (2000) Sid4p is required to localise components of the septation initiation pathway to the spindle pole body in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5249-5254
- Chang M, Jaehning JA. (1997) A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* Dec 15;25(24):4861-5
- Chen T, Zhang MQ (1998) Pombe: a gene-finding and exon-intron structure prediction system for fission yeast. *Yeast* 14: 701-710
- Demeter J, Sazer S (1998) imp2, a new component of the actin ring in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* 143: 415-427
- Egel, R., Willer, M., Kjaerulff, S. Davey, J. and Nielsen O. (1994). Assessment of pheromone production and response in fission yeast by a halo test of induced sporulation. *Yeast* 10, 1347-1354
- Eng K, Naqvi NI, Wong KC, Balasubramanian M. K. (1998) Rng2p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the actomyosin ring and the spindle pole body. *Curr Biol* 1998 May 21;8(11):611-21
- Fan H-Y, Cheng K.K, Klein H. L (1996) Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1Δ* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142(3):749-59.
- Fan H-Y, Klein H.L. (1994) Characterization of mutations that suppress temperature sensitive growth of the *hpr1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137:945-966
- Fankhauser C, Marks J, Reymond A, Simanis V (1993) The *S. pombe cdc16* gene is required both for maintenance of p34cdc2 kinase activity and regulation of septum formation: a link between mitosis and cytokinesis? *EMBO J* 12:2697-2704
- Fankhauser C, Reymond A, Cerutti L, Utzig S, Hofmann K, Simanis V (1995) The *S. pombe cdc15* gene is a key element in the reorganisation of F-actin at mitosis. *Cell* 82:435-444

- Fankhauser C, Simanis V (1994) The cdc7 protein kinase is a dosage dependent regulator of septum formation in fission yeast. *EMBO J* 13:3011-3019
- Feierbach B, Chang F (2001) Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast. *Curr Opin Microbiol* 4:713-719
- Field C, Li R, Oegema K (1999) Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr Opin Cell Biol* Feb;11(1): 68-80
- Flanagan PM, Kelleher RJ, Sayre III MH, Tschochner H, Kornberg RD (1991) A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* 350: 436-438
- Furge KA, Wong K, Armstrong J, Balasubramanian M, Albright CF (1998) Byr4 and cdc16 form a two-component GTPase-activating protein for the spg1 GTPase that controls septation in fission yeast. *Curr Biol* 8:947-954
- Grallert A, Grallert B, Ribar B, Sipiczki M (1998) Coordination of initiation of nuclear division and initiation of cell division in *Schizosaccharomyces pombe*: genetic interactions of mutations. *J. Bacteriol* 180:892-900
- Grallert A, Grallert B, Zilahi E, Szilagyi Z, Sipiczki M (1999) Eleven novel *sep* genes of *Schizosaccharomyces pombe* required for efficient cell separation and sexual differentiation. *Yeast* 15: 669-686
- Grallert, A., Miklos, I., Sipiczki, M (1997) Division-site selection, cell separation and formation of anucleate minicells in *Schizosaccharomyces pombe* mutants resistant to cell-wall lytic enzymes. *Protoplasma* 198:218-229
- Gu W, Malik S, Ito M, Yuan CX, Fondell JD, Zhang X, Martinez E, Qin J, Roeder RG (1999) A novel Human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol Cell* Vol 3. 97-100
- Guertin DA, Chang L, Irshad F, Gould KL, McCollum D (2000) The role of the sid1p kinase and cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast. *EMBO J* 19:1803-1815
- Gutz H, Heslot H, Leupold U, Loprieno N (1974) *Schizosaccharomyces pombe*. In: King RC (ed), *Handbook of genetics*. Plenum Press, New York, pp. 395-446
- Hampsey M, Reinberg D (1999) RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev* 9:132-139

- Ito M, Roeder GR (2001) The TRAP/SMCC/ Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 12: 3 April
- Johnson BF, Calleja GB, Zuker M, McDonald TJ (1982) Cell division: key to cellular morphogenesis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Int Rev Cytol.* 75: 167-208
- Keeney JB, Boeke JD. (1994) Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* Mar;136(3):849-856
- Kitayama C, Sugimoto A, Yamamoto M (1997) Type II myosin heavy chain encoded by the *myo2* gene composes the contractile ring during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* 137:1309-1319
- Le Goff X, Motegi F, Salimova E, Mabuchi I, Simanis V (2000) The *S. pombe rlc1* gene encodes a putative myosin regulatory light chain that binds the type II myosins myo3p and myo2p *J Cell Sci* 113 (23):4157-63
- Le Goff X, Utzig S, Simanis V (1999) Controlling septation in fission yeast. Finding the middle, and timing it right. *Curr Genet* 35:571-584
- Lindner P. (1893) *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gärungserreger. *Wochenschr. Brau.* 10:1298-1300
- Liu J, Tang X, Wang H, Oliferenko S, Balasubramanian MK (2002) The localization of the integral membrane protein cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13:989-1000.
- Liu J, Wang H, Balasubramanian MK (2000) A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 113:1223-1230
- Liu J, Wang H, McCollum D, Balasunbramanian MK (1999) Drc1p/Cps1p, a 1,3  $\beta$ -glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 153: 1193-1203
- MacNeill SA, Nurse P (1997) Cell Cycle Control in Fission Yeast. In: *The Molecular and Cellular Biology of Yeast Saccharomyces* Vol3: Cell cycle and Cell Biology Cold Spring Harbor Laboratory Press 697-765
- Malik S, Roeder RG (2000) Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci* 25:277-283

- Marks, J., Hagan, IM, Hyams, JS (1987) Spatial association of F-actin with growth polarity and septation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol. 23:119-135
- Maundrell K. (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. Gene. Jan 15;123(1):127-30.
- McCollum D, Balasubramanian MK, Pelcher LE, Hemmingsen SM, Gould KL (1995) *Schizosaccharomyces pombe* cdc4+ gene encodes a novel EF-hand protein essential for cytokinesis. J Cell Biol 130(3):651-60
- McCollum D, Feoktistova A, Morphew M, Balasubramanian MK, Gould KL (1996) The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. EMBO J 15:6438-6446
- McCollum D, Gould KL (2001) Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. Trends in Cell Biol Febr 89-95
- Mitchison J.M. (1970) Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. Methods Cell Physiol. 4:131-165.
- Moreno S, Klar A, Nurse P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol 194:795-823
- Moser BA, Russel P (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. Current Op in Microbiology 3: 631-636
- Myers LC, Kornberg RD (2000) Mediator of transcriptional regulation. Annu Rev Biochem 69: 729-749
- Nielsen O, Davey J (1995) Pheromone communication in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Sem. Cell. Biol. 6: 95-101
- Nielsen O, Egel R. (1990) The pat1 protein kinase controls transcription of the mating-type genes in fission yeast. EMBO J 9:1401-1406
- Nurse P (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. Cell Jan 7;100(1):71-78
- Okazaki K, Okazaki N, Kume K, Jinno S, Tanaka K, Okayama H (1990) High frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-clomplementation of *Schizosaccharomyces pombe*. Nucleic Acids Res 18: 6485-6489

- Paoletti A, Chang F (2000) Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol Biol Cell* 11:2757-2773
- Pelham RJ, Chang F (2001) Role of actin polymerisation and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol* 3:235-244
- Rachez C, Freedman PL (2001) Mediator complexes and transcription. *Curr. Op. Cell. Biol.* 13: 274-280
- Ribar B, Banrevi A, Sipiczki M (1997) sep1<sup>+</sup> encodes a transcription-factor homologue of the HNF-3/forkhead DNA-binding-domain family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 202:1-5
- Rothstein RJ (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101:202-11
- Salimova E, Sohrmann M, Fournier N, Simanis V (2000) The *S. pombe* orthologue of the *S. cerevisiae mob1* gene is essential and functions in signalling the onset of septum formation. *J Cell Sci* 113: 1695-1704
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schmidt S, Sohrmann M, Hofmann K, Woollard A, Simanis V. (1997) The spg1p GTPase is an essential dosage-dependent inducer of septum formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* 11:1519-1534
- Schuchert P, Kohli J (1988) The *ade6-M26* mutation of *Schizosaccharomyces pombe* increases the frequency of crossing-overs. *Genetics* 119:507-516
- Sipiczki M (2001) Identification of *Schizosaccharomyces pombe* genes that encode putative homologues of *Saccharomyces cerevisiae* mediator complex subunits. *Acta Microbiol Immunol Hung* 48:519-531
- Sipiczki M, Ferenczy L. (1977) Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating type. *Mol Gen Genet* 151:77-81
- Sipiczki M, Grallert A, Miklos I, Zilahi E, Bozsik A, Szilagy Z (1999) Genetics, physiology and cytology of yeast-mycelial dimorphism in fission yeasts. *Acta Microbiol Immunol Hung* 46:297-302

- Sipiczki M, Grossenbacher-Grunder, Bodi Zs (1990) Recombination and mating-type switching in a ligase-defective mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Gen Genet 220:307-313
- Sipiczki, M, Grallert, B, Miklos I. (1993) Mycelial and syncytial growth in *Schizosaccharomyces pombe* induced by novel septation mutations. J Cell Sci 104:485-493
- Sipiczki, M., Bozsik, A. (2000) The use of morphomutants to investigate septum formation and cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. Arch. Microbiol. 174:386-392
- Song K, Mach KE, Chen CY, Reynolds T, Albright (1996) A novel suppressor of *ras1* in fission yeast, *byr4*, is a dosage dependent inhibitor of cytokinesis. J Cell Biol 133:1307-1319
- Spahr H, Beve J, Larsson T, Bergstrom J, Karlsson KA, Gustafsson CM (2000) Purification and characterization of RNA polymerase II holoenzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. J Biol Chem 275:1351-1356
- Spahr H, Samuelson CO, Baraznenok, V, Ernest I, Huylebroeck D, Remacle JE, Samuelsson T, Kieselbach T, Holmberg S, Gustafsson CM (2001) Analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Mediator reveals a set of essential subunits conserved between yeast and metazoan cells. Proc Natl Acad Sci USA 98:11985-11990
- Sparks CA, Morphey M, McCollum D (1999) Sid2p, a spindle pole body kinase that regulates the onset of cytokinesis. J Cell Biol 146:777-790
- Tolliday N, Bouquin N, Rong L (2001) Assembly and regulation of cytokinetic apparatus in budding yeast. Cur Op in Microbiol 4:690-695
- Wang H, Tang X, Liu J, Trautmann S, Balasundaram D, McCollum D, Balasubramanian MK (2002) The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Biol Cell 13:515-529
- Wong KC, Naqvi NI, Iino Y, Yamamoto M, Balasubramanian MK. (2000) Fission yeast Rng3p: an UCS-domain protein that mediates myosin II assembly during cytokinesis. J Cell Sci 2000 Jul;113 ( Pt 13):2421-32
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA és mtsi (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature Feb 21;415(6874):871-80



- Yamamoto M (1996) The molecular control mechanisms of meiosis in fission yeast. Trends Biochem. Sci. 21:18-22
- Yamamoto M, Imai Y, Watanabe Y (1997) Mating and Sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In: The Molecular and Cellular Biology of Yeast *Saccharomyces* Vol3: Cell cycle and Cell Biology Cold Spring Harbor Laboratory Press 1037-1107
- Zilahi E, Miklos I, Sipiczki M (2000a) The *Schizosaccharomyces pombe* sep15<sup>+</sup> gene encodes a protein homologous to the Med8 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional mediator complex. Curr Genet 38: 227-232
- Zilahi E, Salimova E, Simanis V, Sipiczki M (2000b) The *S. pombe* sep1 gene encodes a nuclear protein that is required for periodic expression of the *cdc15* gene. FEBS Lett. 481(2):105-108.

## 11. A DOKTORI MUNKA SORÁN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

### Cikkek

- Szilágyi Z.**, Grallert A., Nemeth N., Sipiczki M. (2002) The *Schizosaccharomyces pombe* genes, *sep10* and *sep11* encode putative general transcriptional regulators involved in multiple cellular processes. Mol Gen Genomics, Közlésre elfogadva. IF: 2,46
- Bozsik, A., **Szilágyi, Z.**, Benko, Z., Sipiczki, M. (2002). Marker construction and cloning of a *cut1*-like sequence with ARS activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. Yeast 19:485-98. IF:2,82
- Grallert A., Grallert B., Zilahi E., **Szilágyi Z.**, Sipiczki M. (1999) Eleven novel *sep* genes of *Sch. pombe* required for efficient cell separation and sexual differentiation. Yeast 15, 669-686 IF: 2,82
- Sipiczki M, Grallert A, Miklos I, Zilahi E, Bozsik A, **Szilágyi Z** (1999) Genetics, physiology and cytology of yeast-mycetial dimorphism in fission yeast. Acta Microbiol. Hung. 46 297-302 IF: 0
- Sipiczki M., Grallert A, Zilahi E, Miklós I, **Szilágyi Z** (2001) Multifunctional cytokinesis genes in *Schizosaccharomyces pombe*. Acta Biologica Hungarica 52 (2-3) pp. 315-323 IF: 0,29
- Szilágyi Z**, Grallert A, Zilahi E, Sipiczki M (2002) Isolation and characterization of fission yeast genes involved in transcription regulation of cell cycle events. Acta Microbiol. Hung. 49:285-287 IF: 0

### Előadások

- Z Szilágyi**, A Grallert, E Zilahi, M Sipiczki The *Schizosaccharomyces pombe sep10* gene encodes a conservative protein that presumably plays a role in transcription of a subset of genes. First Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology 2000
- Szilágyi Zs**, Grallert Á, Zilahi E, Sipiczki M Transzkripcióban szerepet játszó gének hatásai a sejtciklus események összehangolására. IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai napok 2001

**Szilágyi Zs**, Grallert Á, Zilahi E, Sipiczki M Transzkripcióban szerepet játszó sejtciklus gének jellemzése hasadó élesztőben. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának VI munkaértekezlete 2001

**Szilágyi Zs**, Grallert Á, Zilahi E, Sipiczki M Transzkripcióban szerepet játszó sejtciklus gének hasadó élesztőben. II. Magyar Mikológiai Konferencia 2002

#### Poszterek

Grallert Á, **Szilágyi Zs**, Sipiczki M. Sejtosztódásban sérült *Schizosaccharomyces pombe* mutánsok genetikai és sejttani vizsgálata. VI. Sejt- és Fejlődésbiológiai napok, 1998 , I. díj

**Szilágyi Zs**, Grallert A, Sipiczki M. Sejtszintű differenciálódásban és citokinezisben sérült *Schizosaccharomyces pombe* mutánsok citológiai és genetikai vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 1998

**Szilágyi Zs**, Grallert A, Sipiczki M. A *Schizosaccharomyces pombe sep9* és *sep10* génjeinek genetikai, citológiai és molekuláris biológiai vizsgálata. VII. Sejt- és Fejlődésbiológiai napok, 1999

**Szilágyi Zs**, Grallert A, Sipiczki M. A *Schizosaccharomyces pombe sep10* és *sep11* mutánsainak genetikai, citológiai és a gének molekuláris biológiai vizsgálata. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának IV. Munkaértekezlete 1999

**Szilágyi Zs.**, Grallert A., Sipiczki M. A *Schizosaccharomyces pombe sep10* génjének vizsgálata . Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának V. Munkaértekezlete 2000

**Szilágyi Zs**, Németh N, Sipiczki M Sejtosztódásban és ivari differenciálódásban sérült hasadó élesztő mutáns citológiai és molekuláris genetikai vizsgálata. IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok 2001

Fekete A, Grallert Á, **Szilágyi Zs**, Sipiczki M Magosztódásban és sejtosztódásban szerepet játszó gének genetikai kölcsönhatásának vizsgálata. IX Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok 2001

**Z Szilagyi**, A Grallert, N Nemeth, M Sipiczki Two novel genes of *S. pombe* play a role in the coordination and regulation of cell cycle events. XX<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Prague, 2001

**Schizosaccharomyces pombe sep10 és sep11 génjeinek klónozása és molekuláris genetikai jellemzése**

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

BIOLÓGIA tudományágban

Írta: Szilágyi Zsolt  
okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Biológiai doktori iskolája

(Bioreguláció Molekuláris és Fiziológiai Szerveződése és Biotechnológiai vonatkozásai programja) keretében

Témavezető: Dr. Sipiczki Máttyás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

A doktori szigorlat időpontja: 200... ..

Az értekezés bírálói:

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

A bírálóbizottság

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 200... ..