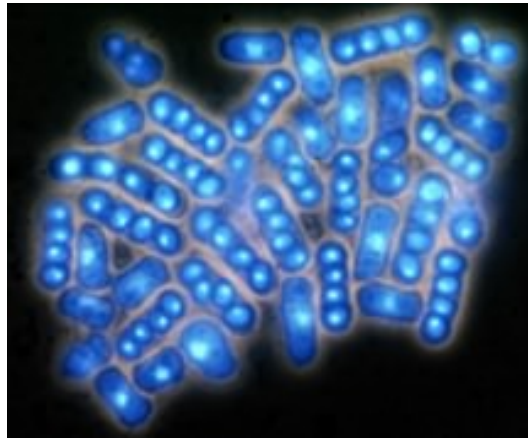


Nehézfémek és vírusfehérjék által okozott oxidatív stresszolyamtok genetikai hátterének vizsgálata

Ph.D. tézis



Készítette: Antal Judit
Ph.D. hallgató

Témavezető: Dr. Pesti Miklós
Tanszékvezető egyetemi tanár

**Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet
Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszék
Pécs, 2006**

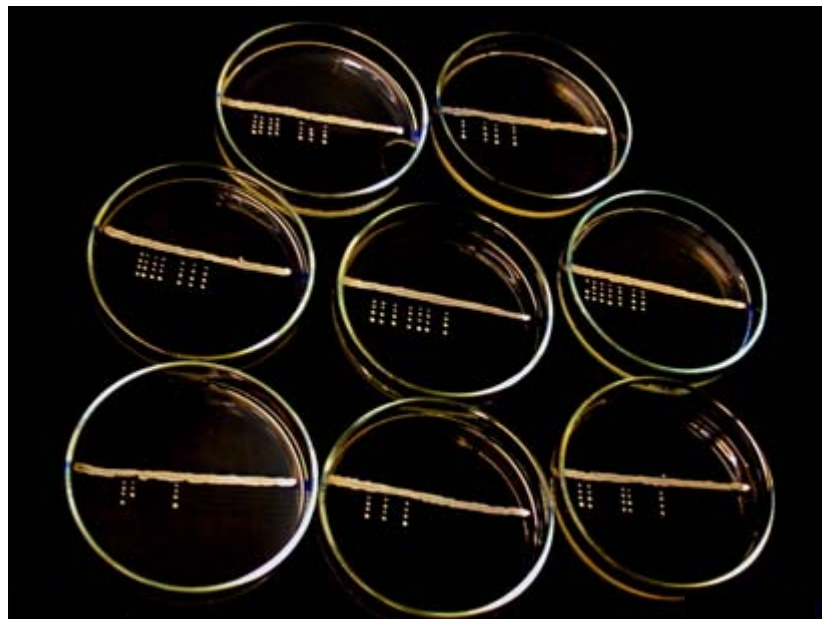
Tartalomjegyzék

Schizosaccharomyces pombe króm-mutánsok klasszikus genetikai jellemzése	5
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i> felfedezése	7
2.2. A <i>S. pombe</i> általános jellemzése	7
2.2.1. A <i>S. pombe</i> rendszertani hovatartozása	7
2.2.2. A <i>S. pombe</i> életciklusa	9
2.2.3. A <i>S. pombe</i> genomja	12
2.2.4. A <i>S. pombe</i> genetikai analízise	
13	
2.3. Krómvegyületek hatása	14
3. Célkitűzés	17
4. Anyagok és módszerek	18
4.1. Mikroorganizmusok	18
4.2. Táptalajok	20
4.4. Módszerek	23
4.4.1. Törzsek fenntartása	23
4.4.2. A tetrádanalízis előkészítése <i>S. pombe</i> -nél	24
4.4.3. Tetrádok tesztelése króm- és cink-toleranciára	27
4.4.4. Tetrádok tesztelése auxotrófiára	28
5. Az eredmények ismertetése, értékelése	29
5.1. A <i>S. pombe</i> tetrádanalízisének előkészítése	29
5.2. A tetrádok tesztelése cink- és króm-toleranciára	31
5.3 Tetrádok tesztelése auxotrófiára	33
6. Összefoglalás	36
7. Függelék	38
7.1. Rövidítések jegyzéke	38
7.2. Irodalomjegyzék	39

Oxidatív stressz hatása HIV-1 Vpr expresszált <i>Schizosaccharomyces pombe</i> sejtekre	41
1. Bevezetés	42
2. Irodalmi áttekintés	43
2.1. Az AIDS és a HIV vírus terjedése	43
2.2. Az AIDS betegség stádiumai	44
2.3. A betegség kezelése	44
2.4. HIV vírus rendszertani besorolása és típusai	45
2.5. A HIV vírus felépítése	47
2.6. A HIV vírus genomja	48
2.7. A Vpr fehérje	49
2.8. A Vpr szerepe a vírusfertőzés során	50
2.9. A Vírusfertőzés mint stressz	51
3. Célkitűzés	53
4. Anyagok és módszerek	54
4.1. Mikroorganizmusok	54
4.2. Táptalajok	54
4.3. Módszerek	57
4.3.1. Törzsek fenntartása	57
4.4.2. Sejtmorfológia- és osztódóképesség vizsgálata	57
4.4.3. <i>S. pombe</i> törzsek tesztelése oxidatív stressz hatására	58
4.4.4. DNS mennyiség és sejtciklus vizsgálatok	58
5. Eredmények	59
6. Diskusszió	64
7. Függelék	67
7.1. Rövidítések jegyzéke	67
7.2. Irodalomjegyzék	68

BYDLV MP vírusdeterminánsának hatása a hasasadó élesztő sejtciklusára és osztódási sajátságaira	73
1. Bevezetés	74
2. Irodalmi áttekintés	75
2.1. A barley yellow dwarf vírus (BYDV)	76
2.2. Stresszhatások következményei génexpresszióra és sejtciklus változásaira	77
3. Célkitűzés	78
4. Anyagok és módszerek	78
4.1. Élesztőtörzsek, plazmidok	79
4.2. Táptalajok, oldatok	83
4.3. Módszerek	87
4.3.1. Törzsek fenntartása	87
4.3.2. Molekuláris biológiai módszerek	87
4.3.3. Transzformálás és a transzformált <i>S. pombe</i> törzsek tesztelése	88
4.3.4. Gén-indukció az <i>S. pombe</i> törzseknél	89
4.3.5. A <i>S. pombe</i> sejtek szaporodásának vizsgálata	89
4.3.6. Sejtciklus-meghatározás	89
4.3.7. A Cdc2 molekula foszforiláltságának meghatározása western blot analízissel	89
4.3.8. A MP által indukált sejtciklus változások vizsgálata Flow Citometriás analízissel	90
4.3.9. Konfokális és fluorescens mikroszkópos vizsgálatok	90
5. Eredmények	91
6. Diskusszió	99
7. Függelék	101
7.1. Rövidítések jegyzéke	101
7.2. Irodalomjegyzék	102
Köszönetnyilvánítás	107

Schizosaccharomyces pombe króm-mutánsok klasszikus genetikai jellemzése



1. Bevezetés

Az élő szervezetek számára bizonyos fémek vegyületei létfontosságúak. Enzimek alkotóiként a fémek nanomólos koncentrációban vannak jelen az élőlényekben.

A fokozott ipari- valamint bányászati eredetű szennyezés miatt egyes fémek koncentrációja az érintett területeken az élő szervezetek számára toxikus szintet is elérheti. (Halliwell B., Gutteridge, M., C. 1998).

Az iparban széleskörben alkalmaznak krómvegyületeket, amelyekben a króm legtöbbször +6-os oxidációs állapotban van jelen, ekkor erős karcinogén és mutagén hatást válthat ki.

Izoláltak azonban olyan mikroorganizmusokat, amelyek a krómmal szemben rezisztenciát mutatnak (Cervantes et al. 1999).

A krómvegyületek eukarióta szervezetekre gyakorolt hatását laboratóriumi körülmények között modelleztük a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő segítségével.

Dolgozatomban kísérleti organizmusból előállított krómtoleráns mutánsok klasszikus genetikai vizsgálatát végeztem el (Moreno et al. 1991). A tetrádanalízis célja részben az volt, hogy megállapíthassuk, a krómtoleranciáért egy vagy több gén tehető felelőssé.

A bizonyítottan egy génben sérült, krómtoleráns jelleget mutató, uracil- illetve uracil és leucin kettős auxotrófiát hordozó spóraklónokat transzformációs kísérletek alanyainak választottuk ki.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A *Schizosaccharomyces pombe* felfedezése

1893-ban Lindner írta le elsőként a *Schizosaccharomyces pombe* nevű hasadó élesztőt, amelyet egy Kelet-afrikai sörből izolált. Az alkoholtartalmú italt "pombe"-nak hívták a helyiek, így az újonnan elnevezett organizmus is ezt a nevet kapta.

A Lindner által felfedezett törzs homotallikus telepeket alkotott, amelyekből h^+ és h^- -os párosodási típusúakat egyaránt talált. A két különböző 'mating type'-ba tartozó sejtek együtt párosodásra képesek, és askospórákat tartalmazó askuszokat hozhatnak létre.

A későbbiekben több kutató is izolált különböző hasadó élesztőt a szubtrópusi régió cukortartalmú fermentációiból. Azonban ezek az újonnan leírt törzsek párosodásra képtelenek voltak és így askospórákat sem hoztak létre (Hochstenbach 1999).

2.2. A *S. pombe* általános jellemzése

2.2.1. A *S. pombe* rendszertani hovatartozása

A *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő az askomycota gombák közé tartozik. Az élesztők meglehetősen diverz csoportot alkotnak fenotípusos jellemzőik miatt, így az elmúlt évszázad alatt gyakran sorolták őket újabb és újabb rendszertani csoportokba. A legújabb kutatások DNS és RNS szekvencia analíziseinek eredményeként azonban megállapítható, hogy az *Ascomycetes* és azon belül is az *Archaeascomycetes* rendszertani kategóriákba sorolható (I. ábra).

Az *Ascomycoták* a legnépesebb törzsét alkotja a gombáknak, mivel az ismert fajok mintegy 30%-át sorolják ide askuszképző tulajdonságuk alapján.

Az *Ascomycota* törzs tagjai askuszokat és ezekben askospórákat képezhetnek. Az askospórák száma fajtól függően változik, ami a legtöbb esetben askuszonként nyolc darab spórát jelent.

Vegetatív állapotban az askomicéta fajokra általában a fonalas szerveződés jellemző, ez egyetlen sejtől álló egységre is redukálódhat az élesztőgombák esetében.

A törzsbe tartozó gombákra fermentációs képesség, illetve bizonyos másodlagos anyagcsere-termékek kiválasztása jellemzi. Ez utóbbiak közül az antibiotikumok, alkaloidok, mikotoxinok a legfontosabb produktumok.

Szexuális és aszexuális szaporodási forma egyaránt megjelenik az aszkomycotáknál. Ivartalan szaporodásuk hasadással és sarjadzással, konídiumképzéssel egyaránt történhet. Ivaros szaporodási formát bizonyos kényszerítő hatásokra, így a nitrogén- és a szénforrásra történő éheztetésre kezdenek.

Kísérleti alanyként a család egyik legismertebb faja, a *Schizosaccharomyces pombe* szolgált, amely több kutatási terület kedvelt alanya.

A hasadó élesztő fiziológiai jellegzetességei miatt laboratóriumban könnyen fenntartható és szaporítható. Három darab kromoszómából álló haploid genommal rendelkezik, ezért a genotípusos változások fenotipikusan jól nyomonkövethetőek.

Kingdom	<i>Mycota</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Archiascomycotina</i> (<i>Taphrinomycotina</i>)
Class	<i>Schizosaccharomycetes</i>
Order	<i>Schizosaccharomycetales</i>
Family	<i>Schizosaccharomycetaceae</i>
Genus	<i>Schizosaccharomyces</i>
Species	<i>S. pombe</i> <i>S. pombe</i> var. <i>pombe</i> <i>S. pombe</i> var. <i>malidevorans</i> <i>S. japonicus</i> (<i>Hasegawaea japonica</i>) <i>S. japonicus</i> var. <i>japonicus</i> <i>S. japonicus</i> var. <i>longobardus</i> <i>S. japonicus</i> var. <i>versatilis</i> <i>S. octosporus</i> (<i>Octosporomyces octosporus</i>)

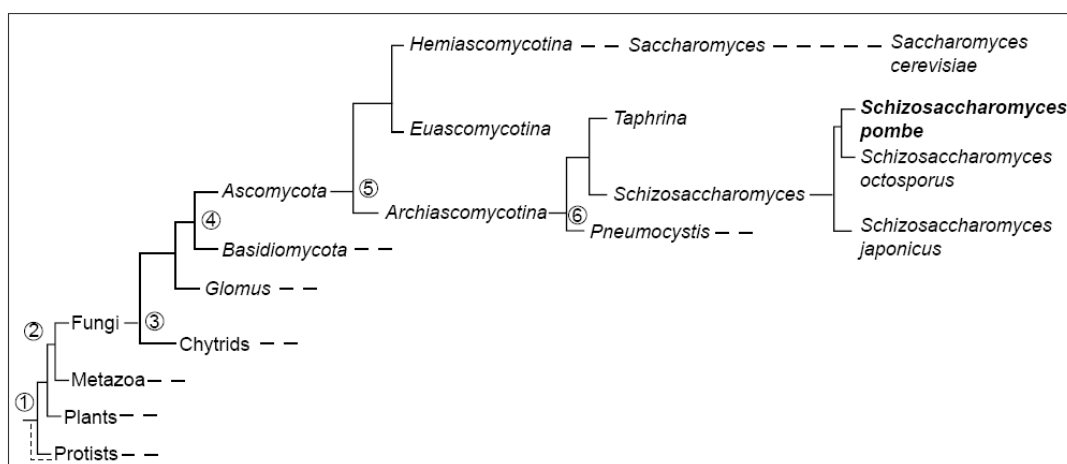


Figure 2
A consensus phylogeny of fission yeasts. Times are (1) 1,200 million years ago (Ma); (2) 1,100 to 1,000 Ma; (3) 600 to 500 Ma; (4) 400 Ma; (5) 420 to 330 Ma; (6) 250 Ma. (Modified from [2,9,12-15,20].)

I. ábra: Az aszkomikóta gombák rendszere (Sipiczki 2000)

2.2.2. A *S. pombe* életciklusa

Normális életciklusa során a *S. pombe* sejtek haploidok, ezért kromoszómáiból, s így génjeiből is csupán egy példány található meg sejtenként.

Kutatási célra a haploid sejtek jól használhatóak, hiszen a domináns és recesszív jellegű genetikai változások egyaránt nyomonkövethetők a fenotípusos megjelenés alapján (Nasim 1989).

A haploid sejteket elsősorban a mitotikus osztódás, mint az aszexuális szaporodás egyik lehetséges formája jellemezheti. A mitózi során a henger alakú sejtek csúcsi részükön növekednek a megfelelő nagyság eléréséig. Majd az így keletkezett anyasejt közepén szeptumot növeszt, amely két utódsejtre osztja. Az utódsejtek az osztódás végén elválnak egymástól. Kedvező körülmények között a teljes sejtciklus körülbelül 3 órányi időt vesz igénybe.

Természetes körülmények között az élesztősejtek gyakran kerülnek tápanyaghiányos környezetbe, amelyre a dimorfizmus jelenségével reagálnak. Ekkor a *S. pombe* élesztő forma helyett pszeudohifa formát képezhet, amelyben az utódsejtek az osztódás után együtt maradnak. A pszeudohifás forma tovább növekszik, az összekapcsolt sejtek számára összességében nagyobb elterjedési felületet engedélyez, ami megkönnyíti számukra a tápanyagok gazdaságos felvételét (Hochstenbach 1999).

A *S. pombe*-t az ivaros szaporodási forma ugyancsak jellemezheti. A hasadó élesztő sejtjei két különböző párosodási típussal jellemezhetők, amelyeket h^+ -al és h^- -al jelölhetünk. Megfelelő körülmények között a két, ellentétes párosodási típusba tartozó sejtek konjugálnak, amelyet sejtfúzió követ, így a sejtek, illetve a sejtmagvak egyesülésével diploid zigóta jön létre (Moreno et al. 1991).

A zigóta ezután meiotikus osztódáson megy keresztül, melynek eredményeként egy zigotikus aszkusz képződik (III.ábra). A zigotikus aszkusz négy darab haploid spórát tartalmaz. Az aszkuszfal szétesése után a spórák tovább osztódva telepeket képeznek, demonstrálva ezzel a meiosis során szerzett új tulajdonság-kombinációkat.

A *S. pombe* sejtciklusát több kísérletben vizsgálták, hogy válasz kapjanak arra, mely gének játszanak szerepet a sejtciklus kontrolljában. Ezen genetikai vizsgálatokban markerként a mutánsok hőmérséklet-érzékenységét is felhasználták (Kiely et al.2000).

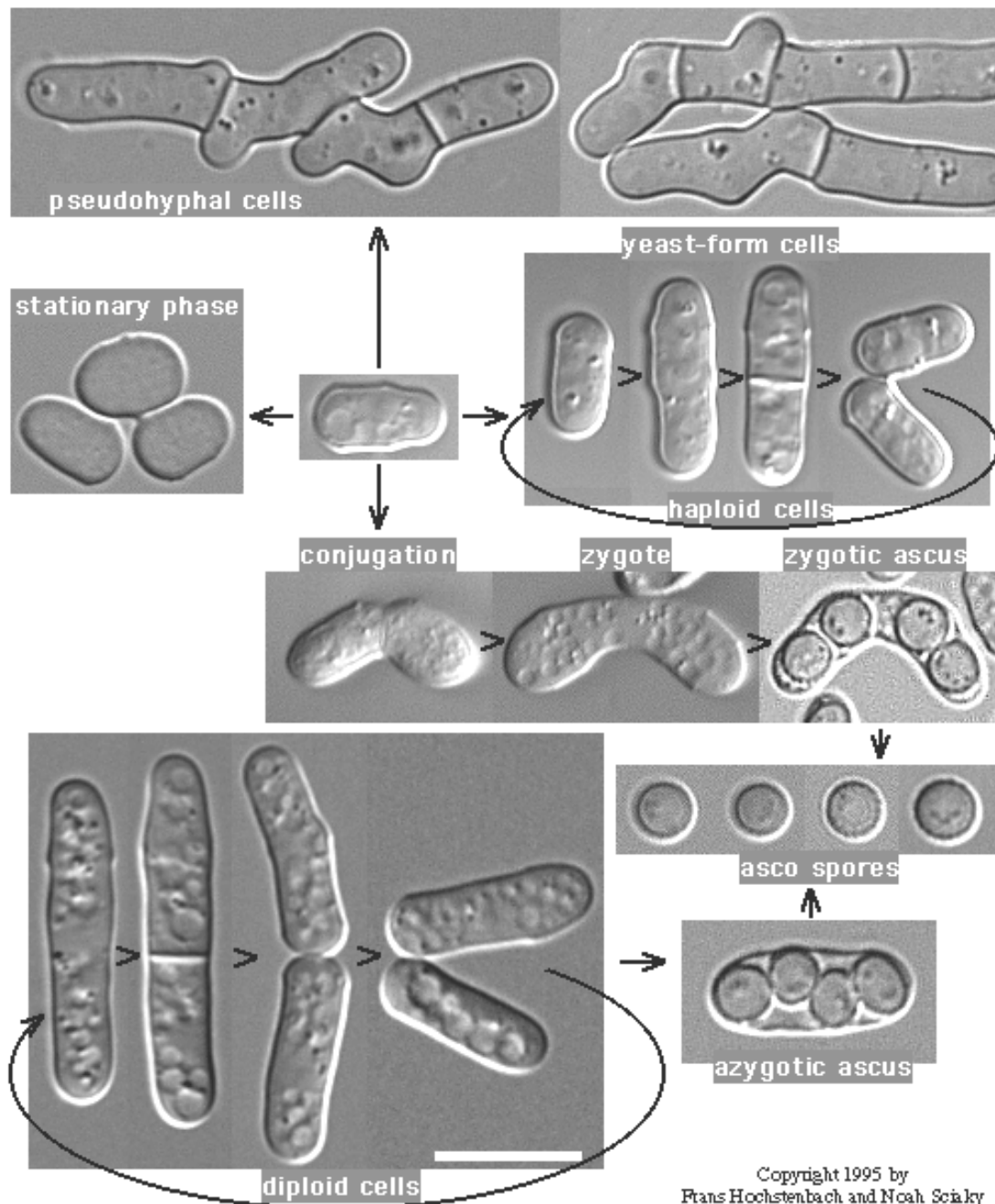
A diploid állapot a *S. pombe* törzsek esetében meglehetősen ritka, mivel nem stabil.

Amennyiben h^+ és h^- -os párosodási típusú diploid sejteket helyezünk spórázáshoz megfelelő körülmények közé, a sejtek egy része konjugál és azigotikus aszkuszokat hoz létre. Az

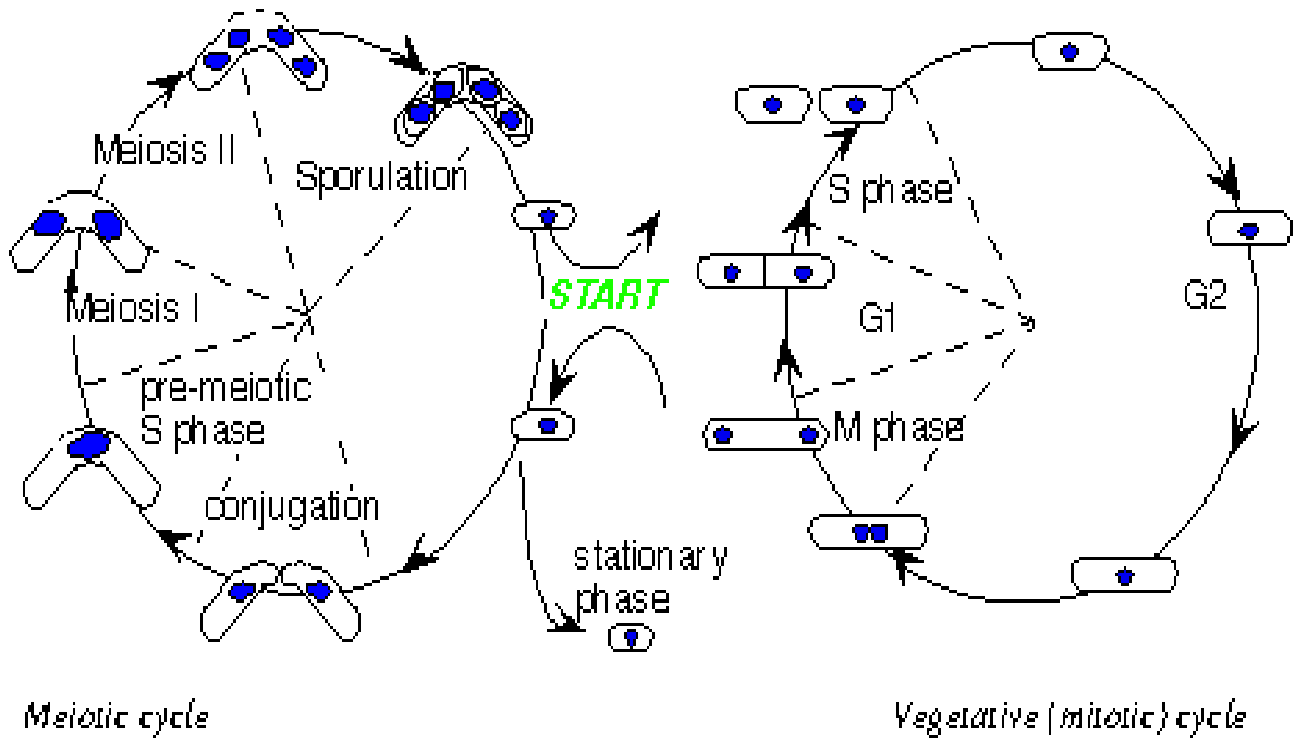
azigotikus aszkuszkok diploid spórákat tartalmaznak, és alakjuk a zigotikus aszkuszkokétól eltérően nem görbült (II. ábra).

A zigotikus aszkusz félhold alakú, jellegzetes képződmény, amely négy darab haploid spórát tartalmaz (II. ábra), ezen spórák tulajdonságainak vizsgálataival kaphatunk információkat a meiózis eseményeiről, illetve bizonyos gének távolságáról (Nasim 1989).

Ezért munkánk során a zigotikus aszkuszkokból származó spórák klónjait használtuk fel azok tulajdonságainak meghatározásához. Az egy aszkuszból származó spórákat tetrádnak nevezzük. Ezen tetrádok a *S. pombe* esetében morfológiailag rendezettek.



Copyright 1995 by
Frans Hochstenbach and Noah Seidky



III. ábra: A *S. pombe* sejtciklusa

2.2.3. A *S. pombe* genomja

A *S. pombe* 3 db kromoszómával rendelkezik. Mivel természetes állapotban az organizmus haploid, így a genotípusos változások fenotípusosan jól nyomonkövethetőek (Nasim 1989).

A *S. pombe* összesen körülbelül 2100 cM, azaz 13.8 Mb-nyi genetikai állománnyal rendelkezik, amely 3 db kromoszómába rendeződik. A *S. pombe* 3 kromoszómájának fizikai méretei egyenként: 5.7 Mb, 4.6Mb, illetve 3.5 Mb (IV. ábra). A hasadó élesztő mitokondriális DNS-e 19,43 kb nagyságú.

A *Schizosaccharomyces pombe* természetes plazmiddal nem rendelkezik. A hasadó élesztő sejtmagjának örökítőanyag-tartalmát (haploid illetve diploid jellegét) flow cytometriás vizsgálatokkal is meghatározhatjuk (Carlson, C., R., et al. 1997).

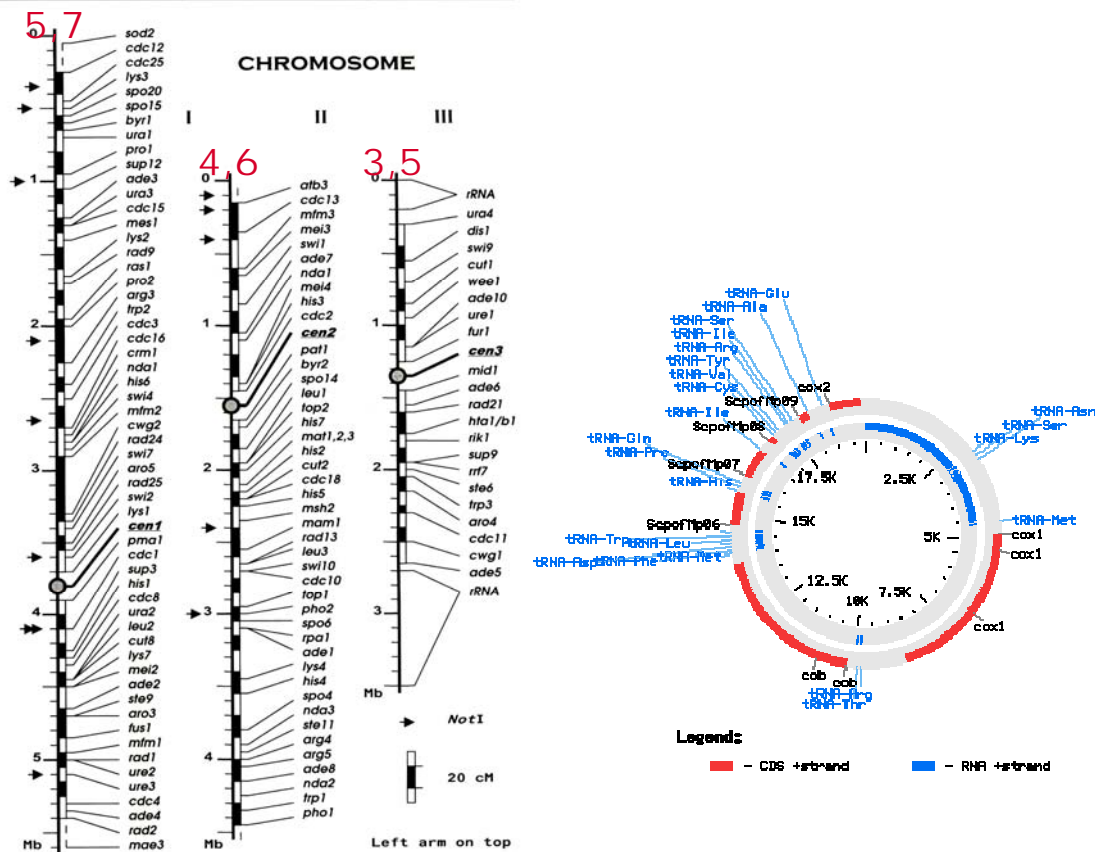


Fig. 1.2. The chromosomal gene map of *S. pombe*, comparing physical and recombinational distances

13,8 Mb

19,431 kb

IV. ábra: A *S. pombe* genom

2.2.4. A *S. pombe* genetikai analízise

A *S. pombe* könnyen kezelhető modellorganizmusnak bizonyult a citológiai, biokémiai, és genetikai kutatások során (Moreno, S. 1991)

A *S. pombe* genetikai analízise során a meiotikus ciklus eredményeként kapott zigotikus aszkuszt illetve az ebből származó haploid spórák vizsgálatát végeztük el. A tetrádanalízis módszerét használhatjuk a maghoz kötött öröklődést mutató tulajdonságok vizsgálatára. Az utódok tulajdonságai alapján mutatott számbeli megoszlásával a meiosis alatt bekövetkező rekombinációs eseményeket követhetjük nyomon. Ez utóbbi segítségünkre lehet a keresett gének távolságának, helyzetének meghatározásában vagyis a géntérképezésben. A munkálatok során legalább egy marker használata szükséges, amely a vizsgált génnel nem kapcsolatosan öröklődik. (Hochstenbach 1999)

A meiosis vizsgálatához a *S. pombe* ivaros szaporodási ciklusára van szükségünk. A hasadó élesztő két, ellentétes párosodási típusába (h^+ és h^-) tartozó sejtek megfelelő körülmények között konjugálhatnak. Ezt a sejtek illetve a sejtmagvak fúziója követi, így alakul ki a diploid zigóta.

A zigóta ezután meiotikus osztódáson, aszkuszképzésen megy keresztül, melynek eredményeként egy jellegzetesen görbült alakú zigotikus aszkusz képződik. Az egyazon zigotikus aszkuszban található négy darab haploid spórát együttesen tetrádnak nevezzük. A hasadó élesztő tetrádjait morfológiai alapon rendezett tetrádnak tekintjük. A tetrádok genetikai célú vizsgálatát pedig tetrádanalízisnek nevezzük.

Az aszkuszfal szétesése után a spórák tovább osztódva telepeket képeznek. Amennyiben közvetlenül az aszkuszfal szétesése után megfelelő helyre, kedvező körülmények közé kerülnek a spórák, a további mitotikus osztódásaik során telepeket képeznek. Mivel a telepek egyazon spóra sejtjéből származnak, azonos genetikai információkat tartalmaznak. Így a képződött telep az adott spóra klónjának tekinthető. A telep tovább szaporítható, tulajdonságait különböző módszerekkel, technikákkal vizsgálhatjuk.

Tetrádanalízishez csak teljes tetrád használható fel. Teljes tetrádot abban az esetben kapunk, ha az egy aszkuszból származó négy spóra mindegyike életképes volt, és így további osztódások során klónokat képzett. A meiosis eseményeinek követéséhez mind a négy spóra vizsgálata szükséges.

Egy „a” és „b” lókuszt közötti rekombinációt tanulmányozva az $ab \times ++$ keresztezésből három lehetséges aszkusztípust kapunk:

ab	a+	ab
ab	a+	a+
++	b+	b+
++	b+	++
szülői ditípus	nem szülői ditípus	tetratípus
parental ditype	nonparental ditype	tetratype
(PD)	(NPD)	(T)

Mivel a tetrádok morfológiailag rendezettek, a spórák sorrendje így nem felismerhető.

Az aszkusztok osztályozása tehát a spórák genotípus-megoszlása szerint lehetséges.

Abban az esetben, ha csupán szülői ditípussal rendelkező spórákat kapunk nem történt rekombináció. A nem szülői ditípus és a tetratípus esetén egyszeres illetve kétszeres rekombináció történt.

A modellorganizmus genetikai vizsgálatokra való alkalmasságát lehetővé teszi a már ismert gének viszonylag nagy száma és egyesek már feltérképezett kapcsoltsági viszonyai (Nasim 1989).

Munkánk során a króm-toleranciáért felelős gén illetve gének vizsgálatát végeztük, markerként a vizsgált törzsek uracil- illetve leucin-auxotrófiáját használtuk fel.

2.3. Krómvegyületek hatásai

A fémek vegyületei az élő szervezetek számára, az esetek többségében esszenciálisak az életműködésekben, anyagcsere folyamatokban résztvevő enzimek felépítéséhez és működéséhez. Ezen szerep ellátásához a nehézfémek nanomólos koncentrációban vannak jelen, azonban az ennél magasabb: mikro- valamint milimólos koncentráció már erősen mérgező is lehet (Nies 1999). A fokozott ipari- valamint bányászati tevékenységből származó szennyezés miatt egyes területeken a nehézfémek koncentrációja az élő szervezetek számára toxikus szintet is elérheti az érintett területeken. (Halliwell 1998).

Az iparban széles körben alkalmaznak krómvegyületeket, amelyek erősen toxikusak. A króm vegyületekben +2 -es és +6 -os közötti oxidációs számmal, vagyis: Cr(II), Cr(III),

Cr(IV), Cr(V), Cr(VI) formában szerepelhet. Az előbb felsoroltak közül a Cr(III) és Cr(VI) a legjelentősebbek.

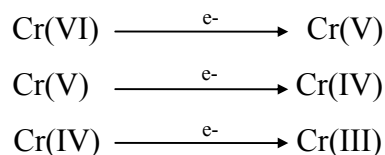
A króm +6-os oxidációs állapotban bizonyítottan erős karcinogén és mutagén hatást fejt ki mikroorganizmusokban és magasabb rendű szervezetekben egyaránt (Cervantes et al. 1999).

A Cr(III) kevésbé káros az élő szervezetekre, vízben kevésbé oldódik, így a sejtekbe csak komplex képződés útján juthat be (Pesti et al. 2000). A Cr(VI) egy nem specifikus transzportrendszeren keresztül jut be a sejtbe.

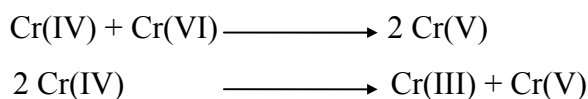
Az élő szervezetekben egy ion potenciálisan annál több élettani folyamatba szól bele, annál nagyobb számú sejtkomponenssel lép reakcióba, minél nagyobb a töltésszáma.

A sejtben gyors redukció játszódik le a redukáló ágensektől függő gyorsasággal.

A Cr(VI) így Cr(III) formává redukálódik (Shi et al. 1999):

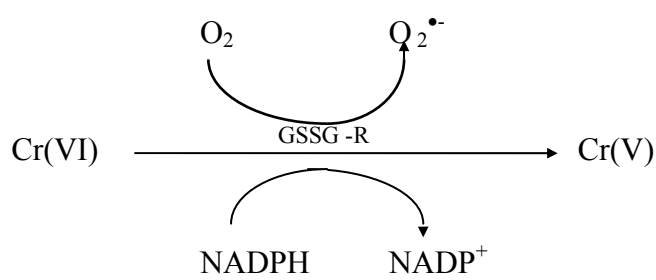


A Cr(V) és Cr(IV) reaktív intermedierjei a folyamatnak, ezért a következő reakciók is lejátszódhatnak:



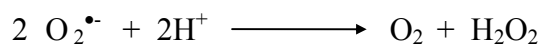
A Cr(VI) redukciójában különböző enzimatis és nem enzimatis faktorok is részt vehetnek.

A flavoenzimek közül a glutation-reduktáz az egyik lehetséges redukáló ágens. NADPH jelenlétében a glutation-reduktáz a Cr(VI) -ot Cr(V) formává redukálja (Shi et al., 1999):

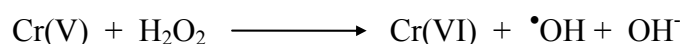


A Cr(V) forma Cr(V)-NADPH komplexként azonosítható ebben az esetben.

A redukció során az oxigénmolekula peroxid-gyökké redukálódik, amely hidrogén-peroxid képződését generálhatja:



A Cr(V)-NADPH komplex a hidrogén-peroxiddal reakcióba lépve hidroxilgyök képződését indukálhatja a továbbiakban egy Fenton-típusú reakció során:



Az átmeneti-fémek ionjai több létfontosságú biokémiai reakcióban játszanak szerepet, melynek során legtöbbször redukálódnak. A redukció többnyire hidroxil-gyök képződésével jár, ezen szabadgyök önmagában is toxikus tényező.

A króm a sejtekbe valószínűleg a szulfátokat transzportáló rendszeren keresztül jut be. A króm ionjai jól ismertek karcinogenikus és mutagén hatásukról, amelyet a fémiparban dolgozó munkásokon végzett vizsgálatok során mutattak ki (Nies 1999). Ezen ionok hatására DNS-károsodás jön létre, amely karcinogenikus illetve mutációs folyamatokat indít el. A mai napig nem tisztázott, hogy közvetlenül a króm hatására, vagy közvetve, a létrejövő reaktív szabadgyökök hatására jön-e létre az örökítőanyag szerkezetének megváltozása.

3. Célkitűzés

A Pécsi Tudományegyetem Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék egyik kutatási területének célja a krómvegyületek hatásmechanizmusának tanulmányozása, a rezisztenciáért ill. szenzitivitásért felelős gének, ill. géntermékek azonosítása eukarióta sejtekben. A munkát különböző krómtoleranciával bíró *S. pombe* mutánsok előállítása előzte meg. NTG (N-metil-N-nitro-N-nitroso guanidin), illetve UV kezelés után történt a mutáns izolálás. A jól jellemzett mutánsok közül (ploiditás, párosodási típus, auxotrófia és back mutációs gyakoriság megállapítása után) a legjobb spóraképző tulajdonsággal rendelkezőket választották ki a további vizsgálatokhoz. Ezek között krómtoleráns és érzékeny (szenzitív) törzsek egyaránt megtalálhatóak. (Czakó-Vér, K., Pesti, M. et al. 1999)

A krómérzékenységet illetve krómtoleranciáért felelős gének azonosítására érdekében először tetrádanalízist végeztünk, melyben markerként uracil- és leucin auxotrófiát használtunk.

A Króm toleráns tulajdonságokkal rendelkező mutánsok közül a *chr1-14 T (chr1-14 T leu1-32 h⁻)*, *chr-09 T (chr-09 T leu1-32 h⁻)*, valamint a .króm szenzitív *chr-23S (chr-23S leu1-32 h⁻)*, *chr-33S (chr-33S leu1-32 h⁻)*, törzseket a 89 *chr⁺ (89 chr⁺ ura 4-D18 h⁺)* –as vad típusú törzzsel kereszteztük. A 82/5 és a 122/6d mutánsokat az SA 21-es vad törzzsel készítettük zigotikus aszkuszok képzésére.

Egyik célunk annak tisztázása volt, hogy a spóráklónok krómtoleranciájának alakulása alapján eldönthessük, egy-génes öröklésmentre utalnak-e az eredmények, vagy esetleg több gén felelős a króm-tolerancia kialakulásáért.

Ezért az első tetrádanalízis és az azt követő tesztelés elvégzése után a olyan spóráklónokat választottunk ki, amelyekben 2:2-es öröklésment figyelhető meg. Ezután a kívánt tulajdonságokat hordozó spóráklónok közül egyet tovább kereszteztünk mindaddig, amíg a keresztezés 2:2-es öröklésmentet mutató spóráklónokat eredményezett, vagyis egy génes mutációt hordozó klónokat kaptunk. Ezek közül olyanokat választottunk ki a további transzformációs kísérletekhez, amelyek krómrezisztencia-jelleget mutatnak és uracil- illetve uracil és leucin kettős auxotrófiát hordoznak.

A keresztezéseket és tetrádanalízist egy génben sérült, uracil auxotróf mutánsok előállítására végeztük, mivel a tanszékünkön jelenleg transzformációs kísérletek folynak, amelyhez a megfelelő (*ura 4-es gén, mint szelekciós markert tartalmazó*) plazmid adott.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Mikroorganizmusok

Sorszám	Laborkód	Publikációs kód	Párosodási típus	Auxotrófia	Eredet
1.	<i>89 chr⁺</i>	<i>89chr⁺ ura 4-D18 h⁺</i>	<i>h⁺</i>	<i>ura 4-D18</i>	KLTE Gen. Tansz. Prof. Sipiczki
2.	<i>chr1-14 T</i>	<i>chr1-14T leu1-32 h⁻</i>	<i>h⁻</i>	<i>leu1-32</i>	PTE Ált. és Körny. Mikr. Tansz.
3.	<i>chr-09 T</i>	<i>chr-09T leu1-32 h⁻</i>	<i>h⁻</i>	<i>leu1-32</i>	PTE Ált. és Körny. Mikr. Tansz.
4.	<i>chr-23S</i>	<i>chr-23S leu1-32 h⁻</i>	<i>h⁻</i>	<i>leu1-32</i>	PTE Ált. és Körny. Mikr. Tansz.
5.	<i>chr-33S</i>	<i>chr-33S leu1-32 h⁻</i>	<i>h⁻</i>	<i>leu1-32</i>	PTE Ált. és Körny. Mikr. Tansz..
6.	<i>82/5a</i>	-	<i>h⁻</i>	<i>ura 4-D18</i>	PTE Ált. és Körny. Mikr. Tansz..
7.	<i>112/6d</i>	-	<i>h⁻</i>	<i>ura 4-D18</i>	PTE Ált. és Körny. Mikr. Tansz..
8.	<i>SA21</i>	<i>SA21</i>	<i>h⁺</i>	-	KLTE Gen. Tansz. Prof. Sipiczki

I. táblázat: A kísérletben használt *Schizosaccharomyces pombe* törzsek

Sorszám	Laborkód	Cr MIC (μ M)	Zn MIC (μ M)	Ploiditás
1.	<i>89 chr⁺</i>	250	2500	H ⁻
2.	<i>chr1-14 T</i>	300	2500	H ⁻
3.	<i>chr-09 T</i>	250	1000	H ⁻
4.	<i>chr-23S</i>	150	2500	H ⁻
5.	<i>chr-33S</i>	125	2500	H ⁻
6.	<i>82/5</i>	250	-	H ⁻
7.	<i>112/6d</i>	275	-	H ⁻
8.	<i>SA21</i>	175	-	H ⁻

II. táblázat: A kísérletben használt *S. pombe* törzsek jellemzői

4.2. Táptalajok

A táptalajok készítéséhez Bacto- illetve Oxoid minőségű, mikrobiológiai tisztaságú anyagokat alkalmaztunk. A tápanyagkiegészítő vegyületek többnyire Reanal gyártmányúak voltak.

A Cr(VI) –ot tartalmazó táptalajok készítéséhez Reanal minőségű $K_2Cr_2O_7$ -ot használtunk. A króm(VI) tartalmú törzsoldat mindig frissen készült, és a sterilizett tápoldatba mértük bele.

YEA táptalaj(1000 ml)

élesztőkivonat (0.5%)	5 g
glükóz (3%)	30 g
agar (2%)	20 g
aminosavak: lizin	100 mg
leucin	150 mg
uracil	100 mg
desztillált víz	1000 ml

MEA táptalaj (1000ml)

maláta (5%)	5 g
élesztőkivontat(0.05%)	0.5 g
agar (2%)	20 g
aminosavak: adenin	200 mg
lizin	200 mg
leucin	200 mg
uracil	200 mg
hisztidin	200 mg
desztillált víz	1000 ml

pH: 5.5

SM táptalaj (1000ml)

glükóz (1%)	10 g
agar(2%)	20 g
(NH ₄)SO ₄ (0.05%)	5 g
KH ₂ PO ₄ (0.1%)	1 g
MgSO ₄ (0.01%)	0.5 g
desztillált víz	1000 ml
vitaminoldat	1 ml

4.3. Oldatok

NaCl-oldat (0.9%)

NaCl (0.9%)	9 g
desztillált víz	1000 ml

K₂Cr₂O₇-oldat (10mM)

K ₂ Cr ₂ O ₇	293 mg
desztillált víz	100 ml

A K₂Cr₂O₇ -oldatot a spóráklónok Cr(VI)-tesztjeinél alkalmaztuk, frissen készítettük el, és a sterilizett YEA táptalajba mértük a megfelelő koncentráció szerint.

A króm(VI) tartalmú törzsoldat adagolása 100ml-nyi (4 Petri-csészényi) YEA táptalajba :

	-	K
1.25 ml	-	120 µM
1.5 ml	-	150 µM
1.75 ml	-	175 µM
2.0 ml	-	200 µM
2.25 ml	-	225 µM
2.5 ml	-	250 µM

2.75 ml	-	275 μ M
3 ml	-	300 μ M

ZnSO₄ oldat (100mM)

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.88 g
desztillált víz	100 ml

A ZnSO₄ -oldatot a spóráklónok Zn(II)-tesztjeinél alkalmaztuk, frissen készítettük el, és a sterilizett YEA táptalajba mértük a megfelelő koncentráció szerint.

A cink(II) tartalmú törzsoldat adagolása 100ml-nyi (4 Petri-csészényi) YEA táptalajba

-	-	K
0.5 ml	-	500 μ M
1 ml	-	1000 μ M
1.5 ml	-	1500 μ M
2 ml	-	2000 μ M
2.5 ml	-	2500 μ M
3 ml	-	3000 μ M

Vitaminoldat

folsav	0.2 mg
biotin	0.2 mg
inozitol	200 mg
Ca-pantotenát	40 mg
p-amino-benzoésav	20 mg
piridoxin HCl	40 mg
aneurin	40 mg
riboflavin	20 mg
nikotinsav	40 mg
desztillált víz	100 ml

A vitaminoldat adagolása 100 ml-nyi SM táptalajba: 100 μ l

Vitaminoldatot a spóráklónok auxotrófia tesztjénél alkalmazott, frissen sterilizált SM táptalajhoz adagoltunk.

Leucin törzsoldat (100 x):

leucin	750 mg
desztillált víz	100 ml

A leucin törzsoldatból SM táptalajba: 34 ml/l

Uracil törzsoldat (50 x):

uracil	375 mg
desztillált víz	100 ml

Az uracil törzsoldatból SM táptalajba: 7 ml/l

4.4. Módszerek

4.4.1. Törzsek fenntartása

A törzseket ferde agarra oltott tenyészetek formájában YEA táptalajon tartottuk fenn.

A törzsek tenyésztése 30 °C -on történt.

A törzseket hosszabb távon +4 °C -on, illetve -80 °C -on, 20 % glicerint tartalmazó tápoldatban tároltuk.

4.4.2. A tetradanalízis előkészítése *S. pombe*-nél

A tetradanalízist egy, már korábban kidolgozott módszer szerint végeztük. (Moreno, S., et al. 1991)

Az első kísérlet során a *89 chr⁺*-es vad típusú törzs és a 9-14-es krómtoleráns mutáns keresztezése történt meg.

A keresztezéshez fiatal, logaritmikus fázisban lévő tenyészeteket használtunk. A *89 chr⁺*-es törzsből egynapos, a 9-14-es mutánsból kétnapos kultúrát használtunk annak lassabb növekedése miatt.

A keresztezéshez (his , ade , lys , leu , ura tartalmú) spóráztató MEA táptalajt készítettünk. A spóráztató táptalajra a keresztezendő partnerekből 1-1 kacsnyi tenyészetet vittünk fel, 40 µl steril desztillált vízben összekevertük és beszárítottuk. Ezt 2 napos inkubálás követte 30 °C-on.

48 óra elmúltával az élőkultúra spórázókéességét ellenőriztük. Ez történhetett jódgőzben történő tárolás után, mivel a I₂ a spórák sejtfalában található keményítővel reagálva jellegzetes „medvebarna” színt ad. Keményítőt a vegetatív sejtek fala nem tartalmaz.

A spórázókéesség ellenőrzésére használt másik eljárás során a szintén 2 napos tenyészetből szuszpenziót készítettünk, majd mikroszkóp alatt Bürker-kamra segítségével számolást végzünk. Ekkor azt vizsgáljuk, hogy 100 db vegetatív sejtre hány darab zigotikus aszkusz jut. Ha ez az arány 2 db/100 db-nál kevesebb, tetradanalízis nem végezhető. A zigotikus aszkuszok jellegzetes görbült alakú képződmények, amelyekben a spórák jól láthatóak mikroszkóp alatt. Az azigotikus aszkuszok alakja az előbbiektől eltérő, egyenes.

A pontosan 48 órás tenyészetből szuszpenziót készítettünk; 1 kacsnyi mennyiséget 200 µl desztillált vízben.

A kb. 0.3 cm vékony YEA lemezre vonaloltás formájában vittük fel a szuszpenziót. A csésze alján alkoholos filctollal 4 vonal formájában megjelöltük a kihúzendó aszkusz illetve spórák lehetséges pozícióját, egymástól mintegy 3 mm távolságban.

A vonaloltásból mikromanipulátor segítségével kerestünk illetve kihúztunk ki a legközelebb eső első vonalra a megfelelő zigotikus aszkuszokat. Melléjük gödröt szúrtunk, hogy később könnyen fellelhetőek legyenek a fénytörési viszonyok alapján.

- A csészéket ezután 30 °C-on inkubáltuk. Körülbelül 1.5-2 óránként ellenőriztük az aszkuszfalak szétesésének állapotát. Mivel az aszkuszfalak szétesésének ideje ennél a keresztezésnél 8 és 16 óra közötti időt vett igénybe 30 °C-os hőmérsékleten, a további

kísérletek során az inkubálás 37 °C-on történt. Ezen a hőmérsékleten az aszkuszfalak szétesése mintegy 4 -10 óra után történt.

- Az aszkuszfal szétesése után a spórákat egymás alá, a megjelölt vonalakra húztuk, tehát minden vonalra egyet. (Összesen 200 x-os nagyítást használtunk munkánkhoz: az okulár 20-as, az objektív 10-es nagyításával.) A spórák szinte egy mozdulattal , a tű felemelése nélkül is a helyükre kerülhetnek. Ekkor a mozgatás gyorsaságának változtatása döntöti el, hogy a spórát húzzuk-e a táptalaj felszínén, vagy 'letesszük-e ' a megfelelő helyre.

- A vékony táptalaj befertőződésének elkerülésére a mikromanipulátor mellett szűrőlággal Bunsen-égő működött, hogy ehhez a levegő dezinficiálását biztosítsa. Az izolált spórák telepeket, spóráklónokat képeztek. Ezek növekedését folyamatosan figyeltük és 3-6 naposan YEA-ból készült ferde táptalajra, illetve lemezre oltottuk a tesztelésig. A spórák jelölése az alábbiak szerint történt:

keresztelés száma / aszkusz száma

spórák: a - legközelebbi, első vonalom levő spóra

b - a második vonalon levő spóra

c - a harmadik vonalon levő spóra

d - legtávolabbi, negyedik vonalon levő spóra

Példaként: 91/22 a b c d (jelöli a 91. számú keresztelés 22. számú aszkuszának 4db spórájából fejlődött 4spóráklónt, vagyis teljes tetrádot.)

A következő kísérletsorozatban a $89 chr^+$ -es és a 9-09-es törzs keresztelését végeztük. Az eljárás az előzőekben vázolt metodikát követte. A $89 chr^+$ -es és 9-09-es szülők kereszteléséhez elegendő volt egynapos tenyészeteket alkalmazni, mivel a növekedési intenzitás megfelelő volt.

A későbbiekben a $89 chr^+$ -es és 9-23, illetve a $89 chr^+$ -es és a 9-33-as keresztelésekre tettünk kísérletet azonos módszerekkel.

A 9-23 -as és a 9-33 -as mutánszt a felhasználást megelőzően -80 °C -on tároltuk.

A ferde agarra történő kioltás után 8 nap múlva mindkét mutáns esetében lassú növekedés volt tapasztalható, amely a 9-23-as mutáns esetében a 9-33-asnál is gyengébbnek mutatkozott. Ebből, a megfelelőképpen kinőtt tenyészetből készített új leoltásaink azonban már 2 naposan használhatóak voltak kísérleti célokra.

A $89 chr^+$ -es és 9-23-as törzseket a korábban már bemutatott módszert követte. Azonban a keresztelt 48 órás tenyészeteket megvizsgálva azt találtunk a Bürker-kamrás számolási

eredmények alapján, hogy a keletkezett zigotikus aszkuszok száma 0 volt. Csupán azigotikus aszkuszokat találtunk, így tetrádanalízist nem tudtunk végezni.

A $89\ chr^+$ -es és 9-33-as törzsek keresztezésekor az előzővel megegyező eredményt kaptunk, ezért ebben az esetben sem volt lehetőség tetrádanalízisre. A két törzs esetében ez 2 x3 keresztezési kísérletet jelentett.

A 9-23-as és a 9-33-as törzsek keresztezése bármely, ellentétes párosodási típusba tartozó partnerrel protoplasztálást követően valószínűleg lehetséges.

4.4.3. Tetrádok tesztelése króm- és cink-toleranciára

A tesztelésnél pontosan 5 napos spóráklónokat vizsgáltunk (Czakó-Vér K., et al. 1999). Ezen tenyészetekből szuszpenziót készítettünk: 2 ml steril fiziológiás sóoldatban kb. fél kacsnyi mennyiséget szuszpendáltunk. Ezt követően Bürker-kamrás számolást végeztünk, majd a megfelelő hígítás segítségével beállítottuk a sejtszámot. A kívánt sejtmennyiség 1 ml oldatban 4×10^6 db sejt volt.

A krómtolerancia megállapítása során a teszteléshez YEA +lys+leu+ura táptalajt használtunk, a megfelelő μM -os krómkoncentrációra beállítva. Kontrollként YEA +lys+leu+ura táptalajt használtunk.

A táptalajok felszínére foltoltás formájában vittük fel a szuszpenziókat. Egy folt 25 μl -nyi szuszpenziót, és így 10^5 db sejtet tartalmazott. A foltoltásokat a frissen elkészített táptalajok felszínére oltottuk. Minden csésze legfelső sorába a két szülői törzs került ellenőrzésképpen. Alájuk a keresztezésükből kapott teljes tetrádok következtek úgy, hogy az egy tetrádból származó spóráklónokat egymás mellé, egy sorba oltottuk. (Legtöbbször oly módon, hogy a keresztezés száma és az aszkuszok sorszáma is növekvő sorrendet mutatott.)

A csészéket 30 °C-on inkubáltuk.

Kiértékelést 7, 10, illetve 14 napos állapotban végeztünk. Erre a króm minimális gátló koncentrációjának (MIC) időben elhúzódó jellege miatt van szükség. A csészékben a koncentráció 25 μM -onként növekedett. A minimális gátló koncentrációt aszerint állapítottuk meg, melyik volt az a koncentráció, amelynél az adott *S. pombe* törzs már nem nőtt. (A minimális gátló koncentráció pontos megállapításához fontos tényező a tesztelt tenyészek adott foltoltásra eső sejtszáma, kora illetve sejtciklus-beli állapota. A vizsgált törzsek sejtszámát beállítottuk a megfelelő értékre. Pontosan 5 napos tenyészeteket használtunk a tesztekhez, ám a mutánsok növekedési intenzitásában nagymértékű eltéréseket tapasztaltunk, és a pontos közép log sejt-fázis beállítására a kísérleti alanyok magas száma miatt nem volt lehetőség.)

A kiértékelés a foltoltások növekedés-intenzitása szerint történt. A szaporodási intenzitást egy 0-tól 5-ig terjedő skála szerint osztályoztuk. A számok jelentése a következő volt:

- 5 –fedett, dús növekedésű folt - erős szaporodás
- 4 –folyamatosan borított, az előzőnél vékonyabb sejt-tömeg
- 3 –több helyen egyesével álló telepek - gyengébb szaporodás
- 2 –hiányos foltok - gyenge szaporodás
- 1 –elszórt telepek a folton

0 – egyáltalán nincs szaporodás

Az értékelés során a spóráklónokat toleráns, vad illetve érzékeny (szenzitív) kategóriákba soroltuk. Az értékelt telepből származó foltoltás növekedését a vad illetve toleráns szülők szaporodási intenzitásával hasonlítottuk össze.

A kapott adatokat kiértékelő táblázatban gyűjtöttük egybe.

A cink-tolerancia teszteléséhez a *89 chr⁺*-es és a 9-09-es törzsek keresztezéséből származó spóráklónokat használtuk fel. A szülői törzsek krómmal szembeni MIC-a csekély, mindössze 50 μM -os különbséget mutatott. A *89 chr⁺*-es törzs esetében 250 μM , míg a 9-09-es törzs esetében 300 μM volt ez az érték. A *89 chr⁺*-es törzs cinkkel szemben mutatott minimális gátló koncentrációja 2500 μM , míg a 9-09-es mutáns esetében 1000 μM volt. Ezen két szülő keresztezéséből származó spóráklónok tehát ideális alanyak tűntek a nehézfém-toleranciáért illetve szenzitivitásért felelős gének feltérképezésében.

A kísérletek kivitelezésében hasonló módon jártunk el, mint a krómteszt esetében. Pontosan 5 napos spóráklónokat használtunk, melyekből szuszpenziót készítettünk szükséges sejtszám beállításával.

A cink minimális gátló koncentrációjának megállapítása során a teszteléshez YEA +lys+leu+ura táptalajt használtunk, a megfelelő, 0 és 300 μM koncentrációra beállítva.

A spóráklónok foltoltásai és a kiértékelés is a krómtesztnél korábban alkalmazott módszer szerint történt. A kapott adatokat kiértékelő táblázatban gyűjtöttük össze.

4.4.4. Tetrádok tesztelése auxotrófiára

Az auxotrófia-teszthez bármely korú spóráklónokat használhattunk, mivel a sejtfázis nem meghatározó tényező ezen vizsgálatoknál.

A tenyészeink szülői törzsei uracil- (*89chr⁺, ura 4-D18h⁺*) illetve leucin-auxotrófiát hordoztak (*chr-14T, leu1-32h⁻* valamint *chr-09T, leu1-32h⁻*), ezért az auxotrófia-vizsgálatokat is ezen a két aminosavval végeztük.

Az aminosav-auxotrófiához SM (minimál táptalaj), SM+ura (uracillal kiegészített minimál), SM+leu (leucinnal kiegészített minimál), SM+ura+leu (uracillal és leucinnal is kiegészített minimál) táptalajokat, valamint kontrollként YEA táptalajokat használtunk.

Mivel az auxotrófia teszt esetében a táptalaj felületére jutó sejtszám nem lényeges tényező, ezért 0.5 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendáltam fel egy inokulumnyi mennyiséget. Majd a

szuszpenziót 6 µl-es foltoltás formájában vittem fel a táptalaj felszínére. A csésze legfelső sorába itt is a szülői törzsek kerültek kontrollként. A bal oldalon mindig az uracil-auxorófiával rendelkező *89 chr⁺*-es törzs helyezkedett el, a jobb oldalon pedig a leucin-auxotróf szülő. Így a petricsészén azonnal látható volt, mely aminosavra történt a szelekció. A krómeszthez hasonlóan a keresztezett partnerek alatt soronként helyezkedtek el a teljes tetrádok spóraklónjai. A keresztezés illetve az aszkusz sorszáma ez esetben is soronként lefelé haladva nőtt. A foltoltások kis mérete miatt így csészénként akár 7 darab teljes tetrád, valamint a szülői törzsek is megfelelően elhelyezhetőek voltak.

A 30 °C-on történő , 7 napos inkubálás után végeztünk kiértékelést.

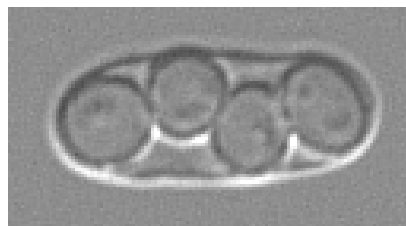
Az eredményeket + illetve - jellel értékeltük aszerint, hogy az adott spóraklón egy csészén belül mutatott-e növekedési intenzitást vagy sem. Ezután a tenyészetek auxotrófiájának megállapításához az 5 csészében mutatott szaporodásuk együttes értékelésére volt szükség.

A kapott adatokat kiértékelő táblázatba írtuk be.

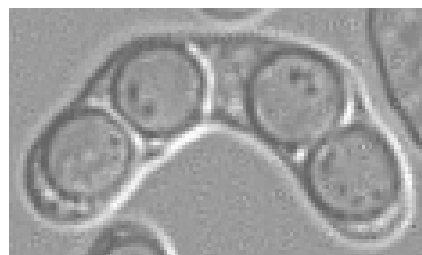
5. Az eredmények ismertetése, értékelése

5.1. A *S. pombe* tetrádanalízisének előkészítése

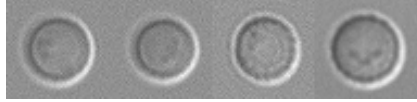
Kísérleteinkhez csupán a szabályos, zigotikus aszkuszokat (2.kép) használtuk fel. Ez, a jellegzetesen görbült alakú képlet jól elkülöníthető az azigotikus aszkuszoktól (1.kép).



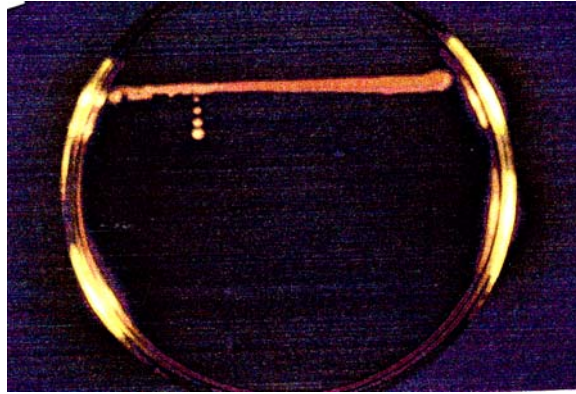
1. kép: Azigotikus aszkusz



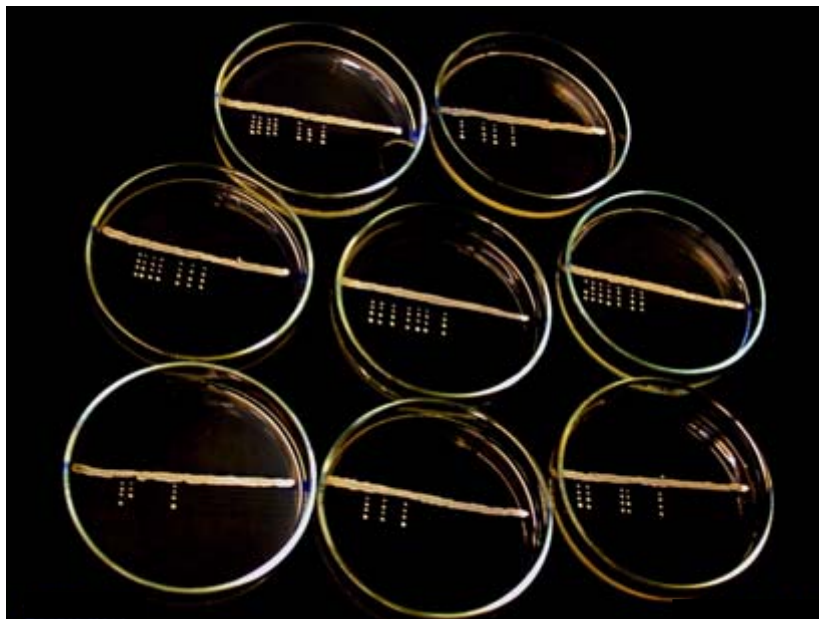
2. kép : Zigotikus aszkusz



3. kép: Spórák az askuszfal szétesése után



4. kép: Izolált teljes tetrád spóráklónjai 3 napos állapotban



5. kép: A 80.számú keresztezés teljes tetrádjai

A $89 chr^+$ és 9-14-es törzsek 8 keresztezésénél 400 db spóra került kihúzásra, ebből 266 db volt életképes, amely 66.5 %-os életképességi arányt jelent.

A $89 chr^+$ és 9-14-es törzsek keresztezéséből összesen 49 db teljes tetrádot kaptunk.

A spóráklónok közül azonban néhány a későbbi átoltások során csökkent életképességet mutatott, vagy el is pusztult.

A $89 chr^+$ -es és a 9-09-es törzsek 4 alkalommal történt keresztezésekor 224 db spóra kihúzása történt meg, ebből 176 db volt életképes, ami 78.57 %-os életképességi arányt jelent.

A 89 *chr*⁺-es és 9-09-es törzsek keresztezéséből összesen 31 db teljes tetrádot kaptunk.

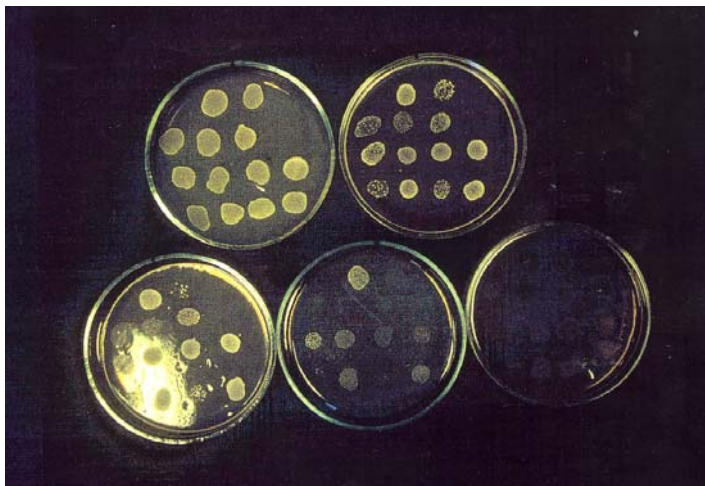
5.2. A tetrádok tesztelése cink- és króm-toleranciára

A tesztelést a teljes tetrádok spóráklónjaival végeztük el (3.kép, 4.kép). A tesztelést foltoltással végeztük úgy, hogy az egy tetrádból származó spóráklónokat egymás mellé oltottuk. A szülői törzsek a petricsésze legelső sorában helyezkednek el (6.kép). Különböző μM koncentrációjú krómtartalmú táptalajon végeztük el a tesztelést 150- és 300 μM -os értékek között. A keresett MIC értéket azon csésze króm-koncentrációja képviselte, ahol az adott spóráklón már nem mutatott növekedést.

A növekedési intenzitások összehasonlításával kaptuk meg az egy teljes tetrád spóráklónjaira vonatkoztatott hasadási arányt (7.kép).

Az adatokat kiértékelő táblázatokban gyűjtöttük össze.

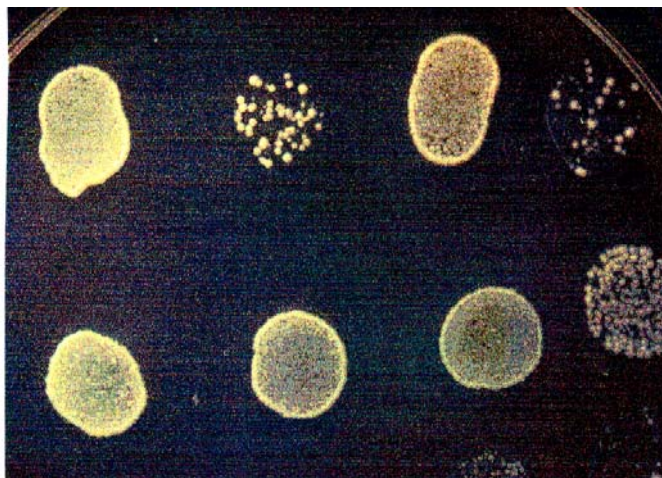
A kiértékelés a módszereknél leírtak alapján történt, a krómrezisztencia tesztelése során 2:2, 3:1, 4:0 és 1:2:1 öröklésmeneteket egyaránt kaptunk.



6. kép: Krómteszt a minimális gátló koncentráció megállapítására

A 6 kép jobb felső sarkában látható a kontroll vagyis a krómmentes csésze, mellette 200 μM króm-koncentrációjú csésze, jobb oldalon alul a 250 μM koncentrációjú csésze, az alsó sorban közepén 275 μM -os, bal oldalon a 300 μM koncentrációjú csésze.

A csészék fotózását 14 nap után végeztük. A 7.kép 1. sorában látható spóráklónok közül a "d" jelű már a kontroll csészén illetve a további kioltások során sem nőtt.



7. kép: A krómteszt növekedési intenzitása alapján megállapítható szegregáció

A 7.kép legalsó sorában egy 2:2-es, míg felette egy 3:1-es hasadási arányt mutató teljes tetrádot kaptunk.

A $89 chr^+$ -es és a 9-14-es törzsek keresztezése	
Szegregáció	A szegregációt mutató tetrádok száma(db)
2:2	16
3:1	10
4:0	1
1:2:1	1

V. táblázat: A $89 chr^+$ -es és 9-14-es törzsek keresztezéséből származó 28 teljes tetrád krómtesztjeinek eredményei

A 2:2 -es szegregációt mutató tetrádok nagy aránya az általunk keresett egygénis öröklésmentre utalt.

A $89 chr^+$ -es és a 9-09-es törzsek keresztezéséből származó teljes tetrádokat cink-tartalmú táptalajokon teszteltük. A Zn(II)-t nem tartalmazó kontroll csészén a vizsgált szülői törzsek illetve a spóráklónok megfelelő növekedési intenzitást mutattak. Azonban az irodalomban jelzett minimális gátló koncentrációk értékeinél (tehát a 1000 és 3000 μM -os

értékek között) sem a szülői törzsek sem a spóráklók nem mutattak növekedési intenzitást 14 nap után.

A kísérlet megismétlésekor az előzőnél jóval alacsonyabb MIC értékekkel dolgoztunk (0 és 500 μM -os értékek között). Ekkor azonban a kontroll csészéhez hasonló növekedési intenzitást mutatva a két szülői törzs, és a vizsgált klónok 3 nap után kinőttek teljesen egyenértékű növekedési intenzitás-értékekkel.

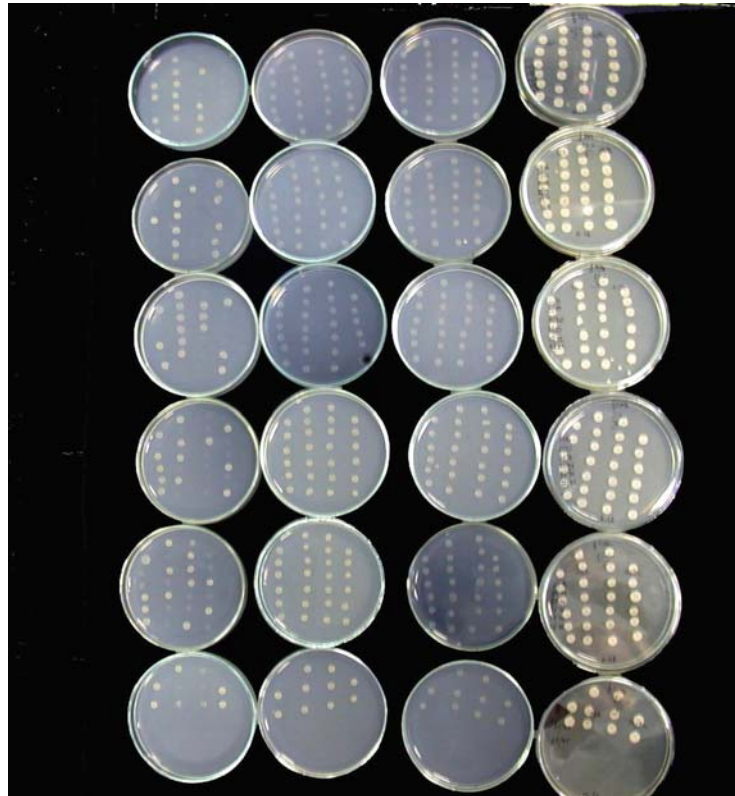
5.3 Tetrádok tesztelése auxotrófiára

A teszteléshez a teljes tetrádok spóráklónjait használtuk fel. A tesztelést foltoltással végeztük úgy, hogy az egy tetrádból származó spóráklónokat egymás mellé oltottuk. A szülői törzsek a Petri-csésze legelső sorában helyezkednek el. Az egyes csészékben különböző aminosav-összetételű táptalajokat alkalmaztunk annak megállapítására, hogy a spóráklónok mely aminosavban szenvednek hiányt, illetve termelők-e.

Vizsgálatainkhoz így SM, SM+ura, SM+leu, SM+leu+ura táptalajokat tartalmazó csészéket, illetve kontrollként YEA táptalajt használtunk.

Aszerint, hogy az adott körülmények között a vizsgált spóráklónok nőttek-e vagy nem állapítottuk meg auxotrófiájukat. Az egy teljes tetrádba tartozó spóráklónok mutatott auxotrófia-típusainak összehasonlításával kaptuk meg az egy teljes tetrád spóráklónjaira vonatkoztatott szegregációt.

Az adatokat kiértékelő táblázatokban gyűjtöttük.



8. kép: Auxotrófia teszt

A 89 <i>chr</i> ⁺ -es és a 9-14-es törzsek keresztezése	
Szegregáció	A szegregációt mutató tetrádok száma(db)
1:1:1:1	16
1:2:1	1
2:2	12

VI.táblázat: A 89 *chr*⁺-es és 9-14-es törzsek keresztezéséből származó 29 db teljes tetrád auxotrófia-tesztjeinek összesített eredményei

A további kísérletekhez azokat a spóráklónokat választottuk ki, amelyek króm-toleráns jelleget mutatnak és uracil- illetve leucin- és uracil- kettős auxotrófiát hordoznak. Ezek a spóráklónok a: 92/7b, 92/7d, 92/8a, 92/8d, 96/3d, 97/14c, 97/14d, 97/18a, 97/18c, 98/1a, 98/1b, 98/3a, 98/5c, 98/7a, 98/9a, 98/9c, 98/10a, 98/13d.

A 89 chr ⁺ -es és a 9-09-es törzsek keresztezése	
Szegregáció	A szegregációt mutató tetradok száma(db)
1:1:1:1	21
1:2:1	4
2:2	6

VII. táblázat: A 89 chr⁺ -es és 9-09-es törzsek keresztezéséből származó 31 db teljes tetrad auxotrófia-tesztjeinek összesített eredményei

6. Összefoglalás

A krómvegyületek eukarióta szervezetekre gyakorolt hatását laboratóriumi körülmények között modelleztük a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő segítségével. A kísérleti organizmusból előállított két, krómtoleráns és króm szenzitív mutáns klasszikus genetikai vizsgálatát végeztem el diplomamunkámban .

1. Spóráklónok izolálása

I. keresztezés:

A 89 chr^+ -es vad típusú törzs ($89chr^+$, $ura4-D18 h^+$) és 9-14-es krómtoleráns mutáns ($chr-14$, $leu1-32 h^-$) keresztezéséből 400 db spórát húztam ki és összesen 49 db teljes tetrádot kaptam. Későbbi munkánk során 19 db teljes tetrád klónjai közül sok elpusztult, illetve csökkent életképességet mutatott. Az életképességi arány mindössze 66.5 % volt. Emiatt a további vizsgálatok elvégzéséhez a spóráklónok viszonylag nagy számára volt szükség.

II. keresztezés:

A 89 chr^+ -es ($ura4-D18 h^+$) valamint 9-09-es ($leu1-32 h^-$) szülői törzsek utódai közül 224 db spóra kihúzásával 31 db teljes tetrádot kaptunk.

III. keresztezés:

A 89 chr^+ -es ($ura4-D18 h^+$) és a 9-23-as ($leu1-32 h^-$) szülők keresztezése során nem kaptam zigotikus aszkuszt, így a tetrádanálízishez nem szolgáltatott számunkra eredményt A 9-23-as mutáns lassú növekedési intenzitása nehezítette a munkát, és keresztezése a megfelelő partnerrel is - az eddigi tapasztalatok alapján - valószínűleg csak protoplaszt készítésével lehetséges.

IV. keresztezés:

A 89 chr^+ -es ($ura4-D18 h^+$) és a 9-33-as ($leu1-32 h^-$) szülők keresztezésekor nem kaptam zigotikus aszkuszt, így tetrádanálízis nem végeztem.

2. Spóráklónok tesztelése auxotrófiára

A 89 *chr*⁺ -es és a 9-14-es törzsek keresztezése során 29 db teljes tetrád auxotrófia-tesztjét végeztük el.

A 89 *chr*⁺ -es és 9-09-es szülők keresztezéséből származó 31 db teljes tetrád klónjait vetettük alá auxotrófia-tesztnek. A spóráklónok között nem csak a várt auxotrófiával rendelkezőket találtunk, közülük egy többszörösen auxotrófnak bizonyult. Ezen spóráklón további auxotrófia-tesztje folyamatban van.

3. Spóráklónok tesztelése króm(VI)-toleranciára

A MIC meghatározásakor a szakmai munkát nehezítette az a tény, hogy a minimális gátló koncentráció sejtszám- és sejtciklus-függő. A vizsgált spóráklónok esetében a sejtszámot pontosan beállítottuk. Ötnapos tenyészetből készült szuszpenziót használtunk, a tesztelendő klónok nagy száma miatt a pontos közép log sejtfázis beállítása technikailag nem volt kivitelezhető. Ez az adott módszer mellett jelentős bizonytalansági tényezőként volt jelen. Azaz a normál fenotípustól mindössze 50 µM-os eltérést mutató toleráns mutánsok MIC pontos meghatározását zavarta. Ezért ha a 2:2-es hasadási arány meghaladta az 50 %-os értéket, akkor a vizsgált mutánst egy génben sérültnek tekintettük.

A 89 *chr*⁺ -es és 9-09-es törzsek keresztezéséből nyert teljes tetrádok spóráklónjainak esetében cink-tolerancia tesztet végeztünk, amely azonban nem bizonyult megfelelő szelektációs markernek.

A keresztezési programban a vad típusú 89 *chr*⁺ -es törzs és a krómtoleráns 9-14-es törzsek tetrádanálízisét végeztük el. A tesztelt 28 db teljes tetrádból a 2:2-es hasadást 16 db mutatta, ami 54.17 %-os arányt jelent. Tehát ebben a 9-14-es számú mutánst egy génben sérültnek tekintettük.

A 89 *chr*⁺ -es és 9-14-es törzsek keresztezéséből a további transzformációs kísérletekhez a következő spóráklónokat választottuk ki, amelyek króm-toleráns jelleget mutatnak és uracil- illetve leucin- és uracil- kettős auxotrófiát hordoznak. Ezek a spóráklónok azonosító kódja a következő: 92/7b, 92/7d, 92/8a, 92/8d, 96/3d, 97/14c, 97/14d, 97/18a, 97/18c, 98/1a, 98/1b, 98/3a, 98/5c, 98/7a, 98/9a, 98/9c, 98/10a, 98/13d .

7. Függelék

7.1. Rövidítések jegyzéke

<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
NTG	N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin
Mb	Megabázis
cM	centiMorgan
M	mol/dm ³
MIC	minimális gátló koncentráció (μM)
<i>h</i> ⁺ , <i>h</i> ⁻	két ellentétes párosodási típus <i>S. pombe</i> -nál
H	haploid
D	diploid
<i>leu</i> ⁻	leucin auxotróf
<i>ura</i> ⁻	uracil auxotróf
<i>leu</i> ⁻ <i>ura</i> ⁻	kettős auxotróf
<i>leu</i> , <i>ura</i>	az aminosavak rövidíse, itt: leucin, uracil
K	kontroll
<i>p</i> ⁺	prototróf
T	króm-toleráns
W	vad típusú, a normal, vagy leggyakoribb fenotípus
S	króm-érzékeny
GSSG-R	glutation-reduktáz

7.2. Irodalomjegyzék

Carlson, C., R., Grallert, B., Bernander, R., Stokke, T., Boye, E. (1997): Measurement of Nuclear DNA Content in Fission Yeast by Flow Cytometry Yeast 13., 1329-1335

Cervantes C., Campos-Garcia I., Devars, S., et al. (1999): Interactions of chromium with microorganisms and plants FEMS Microbiol. Requirements 25., 335-347

Czakó-Vér, K., Batié, M., Raspor, P., Sipiczki, M., Pesti, M. (1999): Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutant of *Schizosaccharomyces pombe* FEMS Microbiology Letters 178., 109-115

Halliwell, B., Gutteridge, J., M., C. (1998): Free Radicals in Biology and Medicine Oxford Press

Hochstenbach, F. (1999): www information on Schizosaccharomyces pombe by Frans Hochstenbach at the University of Amsterdam [http:// www.bio.uva.nl/pombe/](http://www.bio.uva.nl/pombe/)

Kiely, J., Haase, S., B., Russel, P. and Laherwood, J. (2000): Functions of Fission Yeast Orp2 in DNA Replication and Checkpoint Control Genetics 154., 599-607

Moreno, S., Klar., A., Nurse, P. (1991): Molecular Genetic Analysis of Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Methods In Enzymology vol. 194., 795-826

Nasin, A., Young, P., Johnson, F. B. (1989): Molecular Biology of the Fission Yeast Academic Press, San Diego

Nies, D., H. (1999): Resistance to Cd, Co, Zn and Ni in Microbes Appl. Microbiol. Biotechnol. vol. 51.

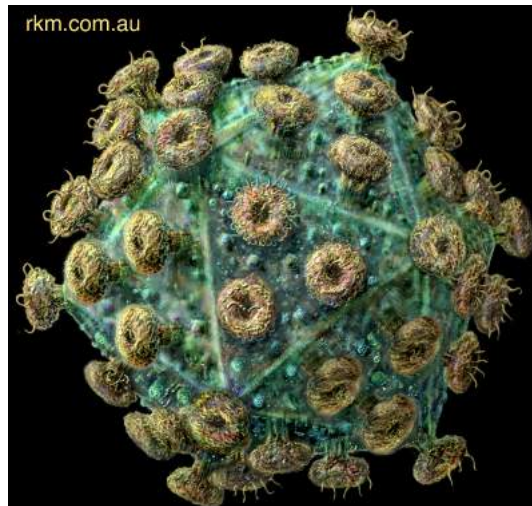
Nies, D., H. (1999): Microbial Heavy-metal Resistance
Appl. Microbiol. Biotechnol. vol. 51., 730-750

Pesti, M., Gazdag, Z. and Belágyi, J. (2000): In vivo interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane, as revealed by EPR spectroscopy
FEMS Microbiol. Letters 182., 375-380

Shi, X., Chiu, A., Chen, C.,T., Halliwell, B., Castranova, V., Vallyathan, V. (1999):
Reduction of chromium (VI) and its relationship to Carcinogenesis
Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2., 87-104.

Sipiczki, M. (2000): Where does fission yeast sit on the tree of life?
Genome Biology 1 (2) reviews 1011.1-1011.4

Oxidatív stressz hatása HIV-1 Vpr expresszált *Schizosaccharomyces pombe* sejtekre



1. Bevezetés

Az AIDS (acquired immune deficiency syndrome) tünetegyüttesét okozó vírusok között a HIV-1-es típusú (human immunodeficiency virus type 1) a leggyakoribb Európában és észak-Amerikában. Az AIDS, mint komplex tünetegyüttes számos szimptomával jellemezhető, melyek közé az immunrendszer általános legyengültsége, rendellenes működése, az ebből adódó fertőzések megbetegedések tartoznak, emellett bizonyos fajta rákos megbetegedések és demencia (szellemi leépüléssel kísért állapotok) is előfordulnak (Pantaleo et al. 1993; Fauci et al. 1996; Altfeld et al. 2001; Basanez and Zimmerberg 2001; Arien et al. 2005). A fertőzött egyénekből származó szövetminták alapján megállapítható, hogy azok oxidatív állapota a betegség különböző stádiumainak megfelelően változik, míg végül, mintegy tíz évvel a HIV-fertőzés után már visszafordíthatatlanul kimoszdul az egyensúlyi állapotból (Perl and Banki 2000).

A különböző HIV illetve a SIV (simian immunodeficiency virus) vírusok egyaránt rendelkeznek egy 15 kDa nagyságú, virionhoz kötött fehérjével, a Vpr-el (viral protein type R) A Vpr protein jelenléte segíti a vírus replikációs ciklusát (Stark and Hay 1998; Zhu et al. 2001; Poon and Chen 2003), és számos fehérjére hatva, eddig nem teljesen ismert módon segíti a vírusfertőzést.

Eukarióta szervezetek sejtjeiben kifejeződve a Vpr fehérje okozza például a magmembrán széttöredezését, G₂/M fázisban a sejtosztódás megállását, végül apoptózishoz vezet emberi és hasadó élesztő sejtekben egyaránt (Chen et al. 1999; Masuda et al. 2000; Elder et al. 2001; Muthumani et al. 2002).

A Vpr – más vírusfehérjékhez hasonlóan – egy feltételezett oxidatív stresszor, mely eddig teljes egészében nem azonosított útvonalon/útvonalakon keresztül hat.

2. Irodalmi áttekintés

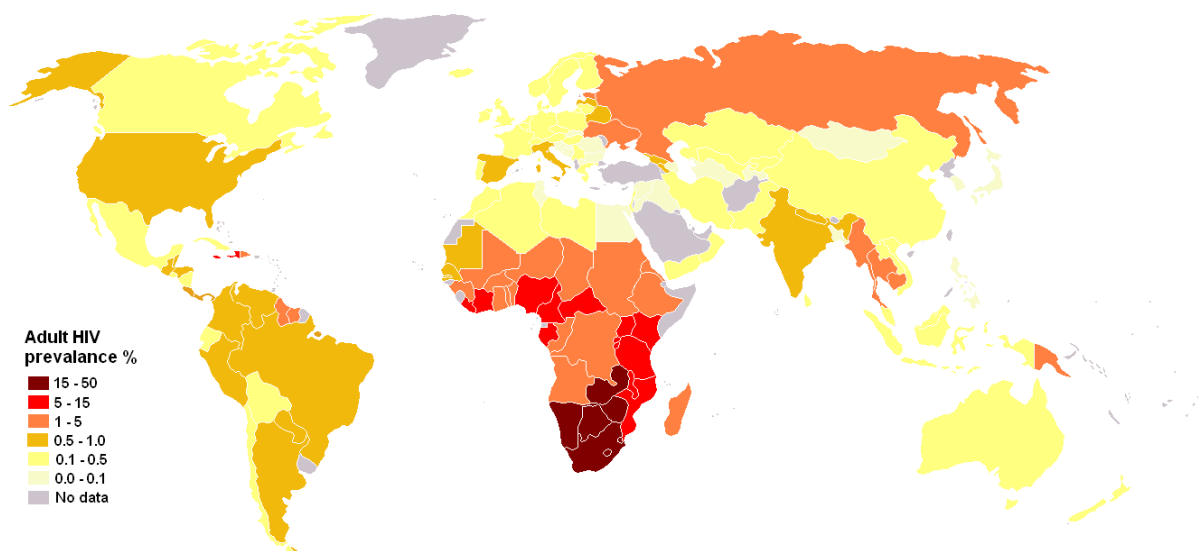
2.1. Az AIDS és a HIV vírus terjedése

Az AIDS (acquired immunodeficiency syndrome vagy acquired immune deficiency syndrome), azaz szerzett immunhiányos tünetegyüttes, mely 1981 óta ismert.

A betegséget a HIV (human immunodeficiency virus) emberi immunhiány vírusa okozza, a fertőzést követően a tünetek általában évekkel (átlagosan 5 évvel) később jelentkeznek, ám a fertőzöttek közben továbbadhatják a vírust. A betegség későbbi stádiumait oportunist fertőzések és tumorok megjelenése jellemzi.

A vírus az immunrendszert legyengíti, a T limfocitákat pusztítja, ezért nagy eséllyel halált okoz, jelenleg csupán tüneti kezelési lehetősége ismert.

A legtöbb kutató szerint a HIV vírus Afrika Szaharától délre eső területeiről származik. Az AIDS már terjedésének első évtizede alatt világméretű járvánnyá vált, jelenleg körülbelül 40 millió ember él ezzel a betegséggel világszerte (I. ábra). Az UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) és a WHO (World Health Organization) 2006-os becslései alapján eddig mintegy 25 millió ember halt meg a betegségben, amit így a világtörténelem legpusztítóbb járványaként emlegetnek.



I. ábra: A HIV vírus elterjedése és gyakorisága (2004)

A fertőzés a HIV vírust tartalmazó testnedvekkel, vérrel vagy nyálkahártyával való közvetlen érintkezés révén terjed. A vírus sejtekbe való beágyazódása előtt – a vírussal történő érintkezést követő mintegy 2 órán belül –elméletileg elpusztítható, erre azonban a technikai korlátok, valamint a folyamatos virális mutációk miatt kicsi az esély. Egyes ritka népcsoportok, például bizonyos kaukázusi csoportok veleszületett védekezéssel rendelkeznek a fertőzéssel szemben.

A jelenleg ismert kezelési módszerek mellett is csak meghosszabbítani lehet a betegek életét.

A nagyszámú áldozat, árván maradt gyermekeik, csonka családok és más szerteágazó hatások miatt az AIDS korunk nagy erkölcsi, társadalmi problémájává vált.

2.2. Az AIDS betegség stádiumai

1. stádium: HIV fertőzés utáni 3-4 hét a HIV vírus **lappangó periódusban** van, a beteg még nem AIDS-es.

A fertőzés utáni nyolc héten belül végzett szűrés negatív eredményt adhat: a vírus hatására termelődő ellenanyagot még nem tudják kimutatni, azonban a vizsgált személy fertőzött és fertőző.

2. stádium: **Primer vagy akut HIV tünetegyüttes** - HIV fertőzést követő 3-6 hétben lép fel. Tünetei: átmeneti nyirokcsomó megnagyobbodás, láz, fáradékonyság, rossz közérzet, izomfájdalom és kanyaró szerű bőrkiütések. A fertőzöttek 1-2 hét alatt hirtelen tünetmentessé válnak.

3 stádium: **Krónikus tünetmentes HIV betegség** - Semmilyen klinikai tünet nincsen, az immunrendszer funkciója kielégítő, közben a vírus szaporodása változatlan mértékben folyik, a CD4⁺ T limfociták száma folyamatosan csökken. Ez az állapot 3-8 évig tart.

4. stádium: **Tünetes HIV betegség** - Megjelenik a krónikus megmagyarázhatatlan hasmenés időszaka, és tovább tart, mint egy hónap. Nyirokcsomó megnagyobbodás, fogyás, lázrohamok, éjjeli izzadás, szájpenész, övsömör.

5 stádium: **Kifejlett HIV betegség, AIDS stádium** - Megjelennek a toxoplazmák az agyban, gombás fertőzések a bőrön, bronhitisz és/vagy tüdőgyulladás, Kaposi szarkóma. Ezt a szakaszt az AIDS betegségnek. Ennek átlagos időtartama 6 hónap-2 év, melyet a halál követ.

2.3. A betegség kezelése

Egyelőre csupán tüneti kezelésre van lehetőség, melynek során az immunrendszer erősítése és a vírusfertőzés lassítása a cél. A vírus elleni hatékony védekezés sokkal nehezebb feladat a kórokozó örökítőanyagának nagyfokú, akár egy egyénben is megfigyelhető variabilitás miatt.

Nagyrészt úgynevezett „koktélokot” alkalmaznak, vagyis az alábbi szerek kombinációját:

-reverz transzkriptáz inhibitorok (nukleozid analógok): pl. AZT, ddI, ddc, 3TC, d4T

-nem nukleozid típusú reverz transzkriptáz inhibitorok: pl. Nevirapine, Delavirdine

-proteáz inhibitorok (a p55 p24-é alakulását gátolja): pl. saquinavir, indinavir, ritonavir

Mivel az AIDS-nek nincs jelenleg ismert ellenszere, ezért a megelőzésre kell nagy figyelmet fordítani, mint a gumióvszer használata, az egyszerhasználatos fecskendőre való áttérés valamint a vérkészítmények szűrése.

2.4. HIV vírus rendszertani besorolása és típusai

A HIV (Human Immunodeficiency Virus, korábbi nevén HTLV-III vagy “lymphadenopathy-associated virus”) a Retrovírusok illetve a Lentivírusok közé tartozik (II. ábra).

Virus classification
Gro Group VI (ssRNA-RT)
Fam Retroviridae
Gen Lentivirus
Spe <i>Human immunodeficiency virus 1</i>
Spe <i>Human immunodeficiency virus 2</i>

II. ábra: A HIV vírusok besorolása

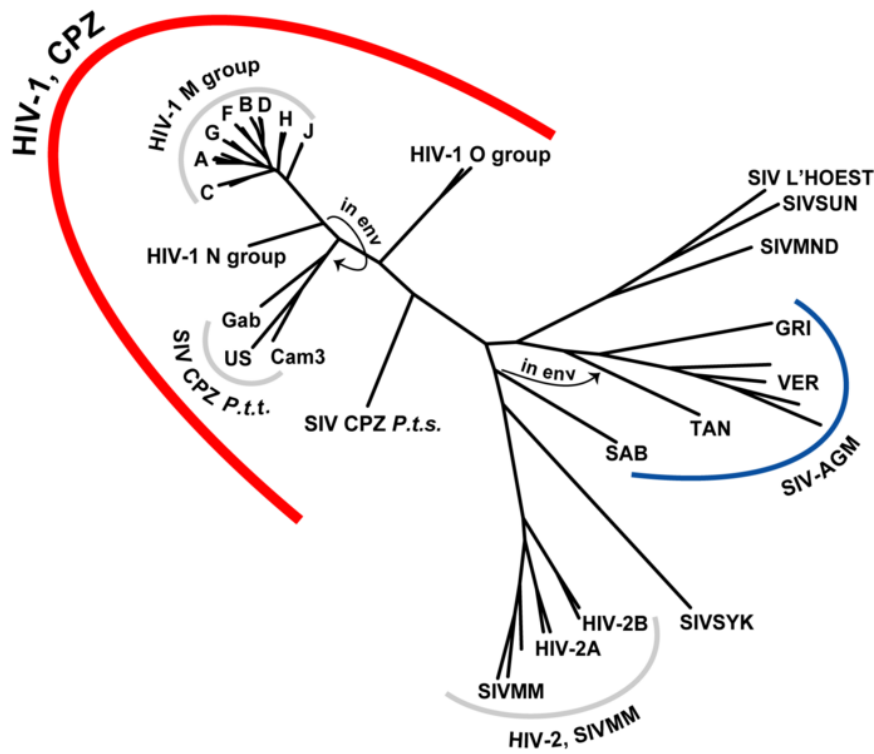
A HIV vírus két fő típusa ismert (III. ábra):

HIV-1 - a leginkább elterjedt, a csimpánzokról terjedt rá az emberre az 1930-as években.

Alcsoportjai:

- M (major) a leggyakoribb. Variánsai: A-H-ig
- N
- O

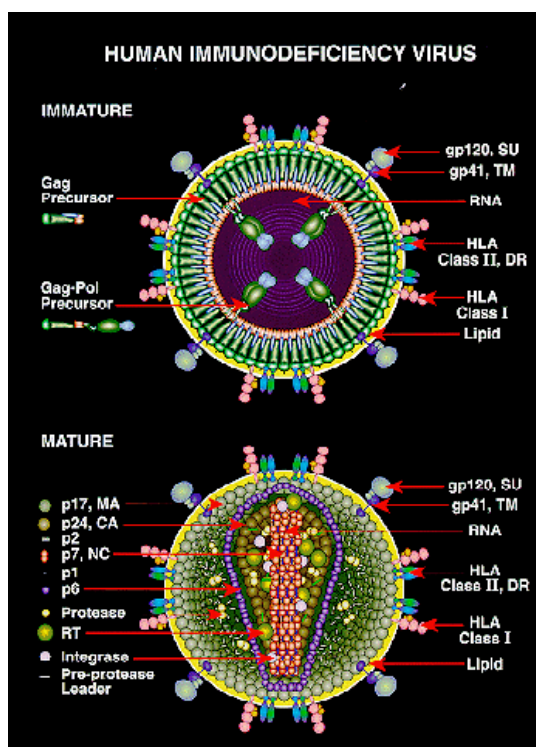
HIV-2 - Nyugat Afrikában gyakori; kevésbé patogén



III. ábra: A HIV és a SIV vírusok filogenetikus kapcsolatai

2.5. A HIV vírus felépítése

A HIV vírus körülbelül 120 nm átmérőjű, nagyjából gömb alakú struktúrával rendelkezik. A HIV-1 két kópiában ss RNS örökítőanyagot tartalmazza, amelyet egy kapszid vesz körül (IV. ábra). Ezt a plazmamembrán határolja, amely a gazdasejtek sejtthártyájából származik. A virion reverz transzkriptáz, integráz és proteáz enzimeket is tartalmaz.



IV. ábra: A HIV vírus felépítése

A retrovírusok felépítése egyszerűbb, mint sok más vírusé, az immunrendszernek azonban nehezebb ellenük harcolni. Ennek oka a vírus örökítőanyagának nagyfokú variálódása a reverz transzkriptáz enzim működése során keletkező nagy mennyiségű hiba és a repair rendszer hiánya miatt. A retrovírusok beágyazzák génjeiket a megtámadott sejt DNS-ébe, tehát minden olyan további sejt, mely ebből a gazdasejtből alakul ki, fertőzött lesz. A HIV vírus membránja a gazdasejtekből származik, ezért összetétele miatt tovább nehezíti a szervezet ellenük történő védekezését. A vírus – mint intracelluláris patogén – rejtőzködni képes az immunrendszer sejtjei elől, integrálódni képes a gazdasejt genomjába, így láthatatlanná válik számukra.

A HIV az immunrendszer makrofágait, dendritikus- és CD4+ T-limfocita sejtjeit támadja meg. A vírus behatol a sejtbe, beilleszti saját génjeit a gazdasejt DNS-ébe, és így arra használja, hogy újabb vírusokat termeljen, amelyek megfertőzik a többi sejtet. A CD4+ gazdasejtek végül elpusztulnak. Ahogy a szervezet CD4+ sejtszáma csökken, az emberi test egyre kevésbé képes harcolni a betegségekkel szemben. Végül a CD4+ sejtszám eléri azt a kritikus szintet, amelyet

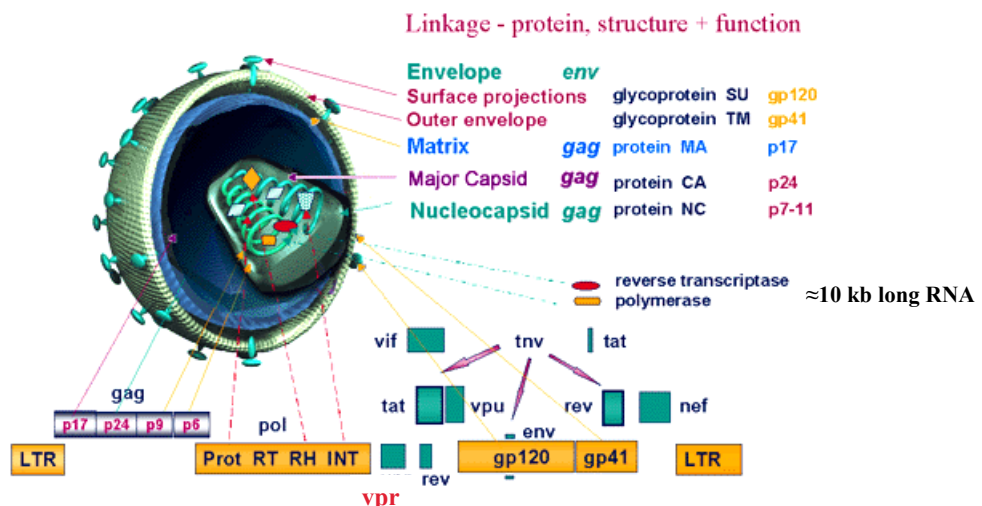
szerzett immunhiányos tünet-együttesnek, vagyis AIDS-nek nevezünk. A HIV vírus közvetlenül megtámad egyes szerveket is, mint például a veséket, a szívet és az agyat, így akut veseelégtelenséghez, cardiomyopathiához (szívizomgyulladás), dementiához (szellemi diszfunkciókhoz) és encephalopáthiához (agyvelőgyulladás) vezet.

A vírus által legyengített immunrendszer végül védtelenné válik az opportunista fertőzések és rákos megbetegedések ellen.

2.6. A HIV vírus genomja

A Retrovírusoknak hasonlóan számos strukturális fehérjét kódoló génje van (gag, pol, env).

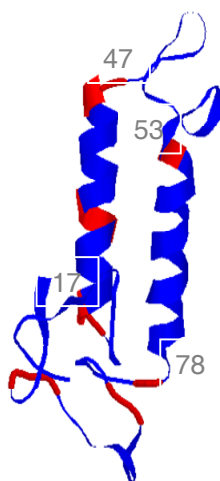
A HIV vírusra emellett jellemző nem strukturális vagy „accessory” gének tat, rev, nef, vif, vpu és vpr. A Tat, Rev és a Vpr fehérjék esszenciálisak a vírus fertőzőképességéhez (V. ábra). Az env gén által kódolt gp120 és gp41 proteinek szerepe a vírus gazdasejthez történő tapadásban és fúzióban, így a fertőzés elősegítésében van.



V. ábra: A HIV-1-es vírus lentivirus felépítése és genomja

2.7. A Vpr fehérje

A különböző HIV illetve a SIV (simian immunodeficiency virus) vírusok egyaránt rendelkeznek egy 15 kDa nagyságú, 96 aminosavból álló, virionhoz kötött fehérjével, a Vpr-el (viral protein R) (VI. ábra). A Vpr proteinnak vad VprNL4-3, illetve különböző mutáns típusai lehetnek, mint például VprF34I, VprLAI, VprW56R. A Vpr fehérje eltérő változatai más-más célmolekulákon keresztül eltérő módon és súlyossággal károsítják a gazdasejteket. A különböző típusokra egyaránt jellemző, hogy G2/M fázisban megállítják a sejtek szaporodását, azonban a vad típusú VprNL4-3 apoptózist indukálva el is pusztítja a sejteket.



VI. ábra: A VprNL4-3 fehérje háromdimenziós szerkeze

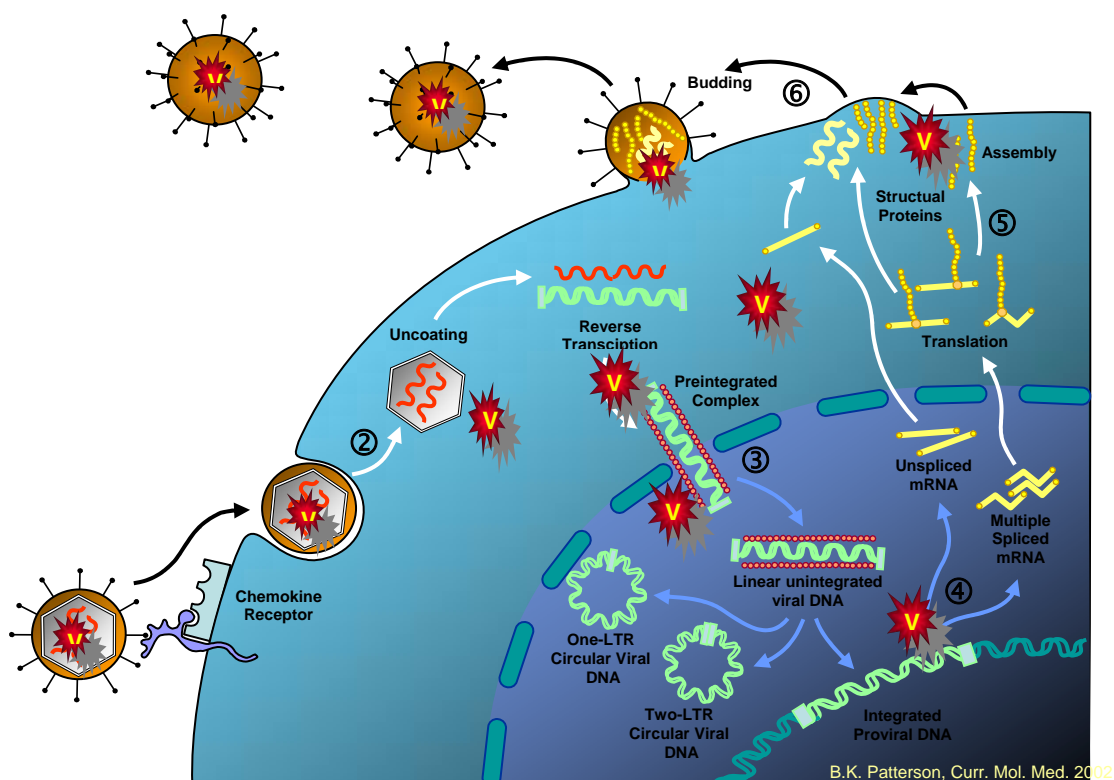
A HIV-fertőzöttek sejtjeiben különböző a Vpr fehérje több formában lehet jelen, úgy mint virionhoz kötött (fertőző és nem fertőző formában), sejthez kötött és szabad Vpr molekulák. (Tungaturthi et al. 2003).

2.8. A Vpr szerepe a vírusfertőzés során

A Vpr jelenléte segíti a preintegrációs komplex sejtmagba történő bejutását, reverz transzkripciót, a vírus replikációs ciklusát (Stark and Hay 1998; Zhu et al. 2001; Poon and Chen 2003), apoptózis idéző módon segíti a vírusfertőzést.

Eukarióta szervezetek sejtjeiben a Vpr fehérje jelenléte többek között a magmembránhoz való kötődését, és annak szétbontását, a virális promóter transzaktivációját, immunszuppressziót, a CD4T limfociták elpusztítását, G₂/M sejt fázis blokkot és apoptózis okozó eukarióta szervezetekben, így emberben és hasadós élesztőben egyaránt (Chen et al. 1999; Masuda et al. 2000; Elder et al. 2001; Muthumani et al. 2002).

Ezen funkciókat a Vpr, mint egy feltételezett oxidatív stresszor hozza létre eddig teljes egészében nem azonosított módon, és több feltételezett útvonalon keresztül (Yoshizuka et al. 2005), melynek főbb elemei a Cdc2, Cdc25, Pp2A, Wee1, Rad24 (Masuda et al. 2000; Elder et al. 2001) (VII. ábra).

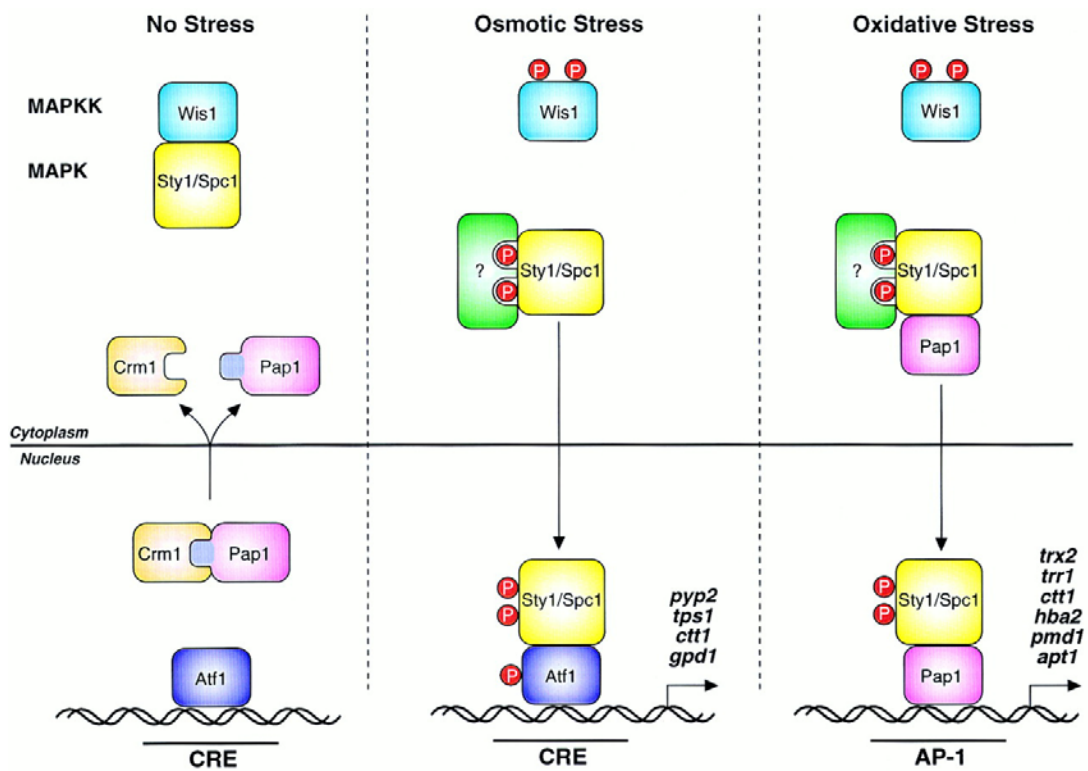


VII. ábra: A Vpr fehérje szerepe a vírusfertőzés során

2.9. A Vírusfertőzés mint stressz

A vírusfertőzések különböző fázisai gyakran oxidatív stresszt és apoptózist okoznak a gazdasejtekben (Valyi-Nagy and Dermody 2005). Az oxido-redukciós egyensúly felborulásának fő okozói egyes vírusfehérjék, mint azt például a HIV-1-es vírus gp120 és Tat proteinjeinek esetében ezt már bizonyították (Lachgar et al. 1999; Kim et al. 2003; Price et al. 2005).

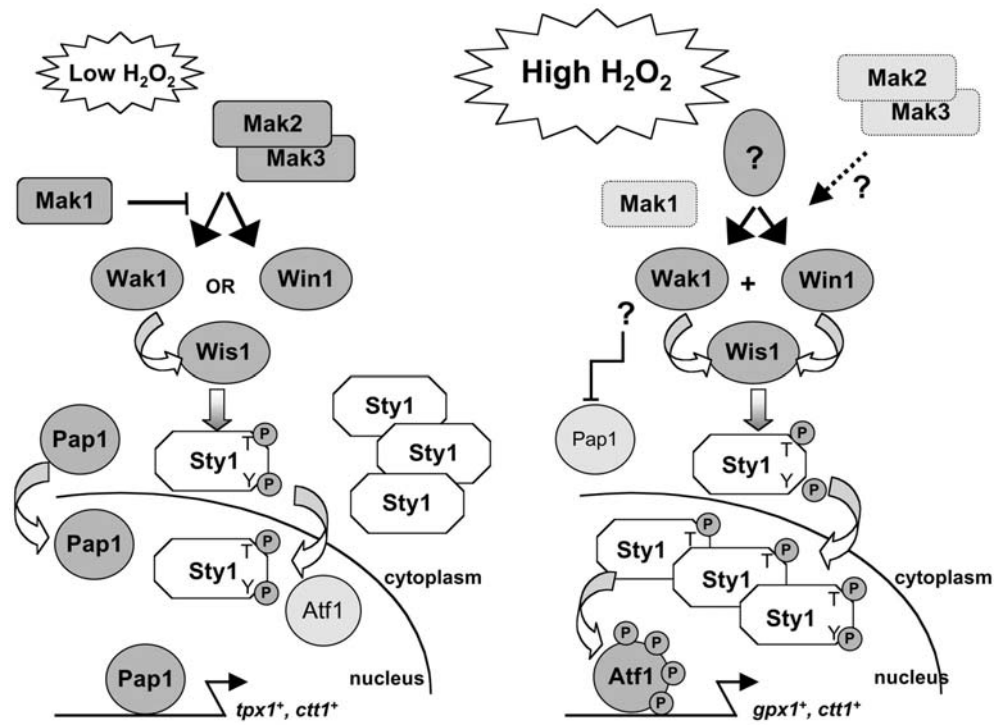
Az oxidatív stressz az oxidatív egyensúly megváltozását jelenti az eredeti állapothoz viszonyva (Sies 1993). A reaktív oxigéngyökök (ROS), mint például a hidroxil gyök, a hidrogén-peroxid (H_2O_2), és a szuperoxid anion minden aerob szervezetben jelen vannak, mint a légzési oxigén redukciójának eredménye, illetve egyes celluláris enzimek működésének termékei.



Wilkinson and Millar 1998

VIII. ábra: Egyes stresszhatásokra bekövetkező génexpressziós változások

A stressz típusától, időtartamától illetve erősségétől függően különböző celluláris védekező reakciók lépnek működésbe (VIII. ábra). A sejtkárosító hatásokra egyes transzkripciós faktorok aktivációja, génexpressziós- és sejtciklus változások történhetnek (IX. ábra), amelyek végül időleges adaptációhoz és/vagy apoptózishoz vezetnek. (Gazdag et al. 2003; Chen et al. 2003; Pócsi et al. 2004).



Quinn et al. 2002

IX. ábra: Génexpressziós változások oxidatív stressz különböző dózisaira

Bizonyos stresszhatásokra: Vpr fehérje hatására például G_2 -, hidoxi-urea hatására G_1 fázisban megáll a sejtosztódás. A sejtciklus stop során a megfelelő repair rendszerek kijavíthatják a hibát, és folytatódik a mitózis, ha ez nem sikerül a sejtek elpusztulnak.

3. Célkitűzés

A HIV-1-es vírus vad típusú VprNL4-3 fehérjéje esszenciális a virális fertőzés eredményességéhez, eukarióta sejtekben kifejeződve számos sejtkárosító funkcióval bír, és így a sejtciklus G₂/M fázisok határán történő leállásához és végül sejthalálhoz vezet. Irodalmi adatok alapján a VprNL4-3 fehérjéről feltételezik, hogy a gazdasejtek oxidatív állapotában változást és végül más intracelluláris változások után apoptózist okoz. Bár eddig csupán a HIV-1-es vírus Gp120 és Tat fehérjéiről bizonyították oxidatív hatásukat.

A kísérletekhez az RE007-es törzset használtuk, mivel ez a VprNL4-3 gént tartalmazza egy kópiás integráns formában.

Ahhoz, hogy a Vpr-ről mint lehetséges oxidatív ágensről hatásáról ismereteket szerezzünk a Vpr fehérje és oxidatív stressz viszonyát hasadó élesztő *S. pombe* modellen vizsgáltuk. A Vpr-indukált *S. pombe* sejtek oxidatív stresszorról, hidrogén-peroxiddal való kezelésének eredményét vizsgáltuk különböző intenzitású és eltérő idejű stressznek kitéve a Vpr expresszált és Vpr represszált sejt kultúrákat. Kísérleteinkkel a Vpr fehérje és az oxidatív stressz kapcsolatába szerettünk volna betekintést nyerni, a további kutatásokhoz útmutatást kapni a Vpr protein eddig nem vizsgált hatásaira, célfehérjéire, útvonalára

Alacsony, szubinhibítoros koncentrációjú hidrogén peroxiddal illetve alacsony koncentrációjú tiaminnal kezelt kultúrákban az RE007-es törzs szaporodásának mértékét, a sejtek morfológiáját figyeltük meg, valamint sejtciklus-analízist végeztünk.

A Vpr-t kifejező *S. pombe* sejteket különböző időtartamú adaptív és akut hidrogén peroxid stressznek kitéve vizsgáltuk a sejtpusztulás mértékét, a sejtek hosszát, illetve DNS tartalmát.

A Vpr-expresszált *S. pombe* sejteket 0,15 mM H₂O₂-vel és 0.1 μM tiaminnal egyidejűleg kezelve megnövekedett a sejtek túlélése, a sejtosztódás mértéke, és lecsökkent a cdc-fenotípust mutató sejtek aránya. H₂O₂-által indukált akut stressz hatása utáni első sejtciklusban a Vpr-expresszált sejtek túlélése szignifikánsan megnőtt a kezeletlenekhez képest. Adaptív stresszátást követő 2.-4. sejtciklusban növekedett a túlélő sejtek száma a Vpr expresszió ellenére. Feltételezésünk szerint a H₂O₂-által aktivált MAPK útvonal enzimeit okozták a változást.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Mikroorganizmusok

A Vpr fehérje eukarióta sejtekre kifejtett hatásának vizsgálatához a korábban kidolgozott in vivo módszerek tűntek a legalkalmasabbnak, vagyis speciális *S. pombe* törzsek kellett használnunk (I.táblázat).

Kísérleteinkhez kontrollként az SP223-as szülői törzset használtuk, amely háromszoros stabil auxotrófiával és 1×10^9 -ennél kisebb mutációs gyakorisággal jellemezhető. Az RE007-es az SP223-as szülői törzs ura4-es lókuszába egy kópiás vad típusú Vpr(NL4-3) és nmt1-es (full strength) promóterrel ellátott konstrukciót integráltattak.

Törzs	Genotípus	Vpr	Promóter	Eredet
SP223	leu1-32 ura4-D18 ⁻ ade6-M210 h ⁻	-	-	Yuqi Zhao, Children's Memorial Institute for Education and Research, Northwestern University, Chicago, U.S.A.)
RE007	leu1-32 ura4-D18 ⁻ VprNL4-3::ura4 ⁺ ade6-M210 h ⁻	VprNL4-3	nmt1	Yuqi Zhao, Children's Memorial Institute for Education and Research, Northwestern University, Chicago, U.S.A.)

I. táblázat: A kísérletekhez használt *Schizosaccharomyces pombe* törzsek

4.2. Táptalajok

A táptalajok készítéséhez Oxoid minőségű agart használtunk. A tápanyagkiegészítő vegyületek Spektrum 3D gyártmányúak voltak.

EMM (Edinburgh Minimal Medium)

D-glükóz	20g
K ⁺ ftalát	3 g
Na ₂ HPO ₄	2,2 g
NH ₄ Cl	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,014 g
KCl	1 g
Na ₂ SO ₄	0,040 g
+EMM vitamin oldat	1 ml
+EMM nyomelem oldat	0,1 ml
Ade	250 mg/l
Leu	250 mg/l
Ura	250 mg/l
(Nurse 'Fission Yeast Handbook' szerint)	
Agar	17 g

Limitált nitrogén tartalmú (2,5 mM) EMM

D-glükóz	20g
K ⁺ ftalát	3 g
Na ₂ HPO ₄	2,2 g
NH ₄ Cl	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,014 g
KCl	1 g
Na ₂ SO ₄	0,040 g
+EMM vitamin oldat	1 ml
+EMM nyomelem oldat	0,1 ml
Ade	250 mg/l
Leu	250 mg/l

Ura	250 mg/l
Agar	17 g

EMM vitamin oldat 500 ml (10^3 -szeres) :

Pantoténsav	1 g
Nikotinsav	10 g
Inositol	10 g
Biotin	1 g

EMM nyomelem oldat 500ml (10^4 -szeres):

H ₃ BO ₃	2,5 g
MnSO ₄ .H ₂ O	2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2 g
FeCl ₂ .6H ₂ O	1 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,02 g
KI	0,5 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,2 g
Citromsav	0,5 g

100 mM H₂O₂ oldat:

H ₂ O ₂	57 µl
EMM tápoldat	4.943 ml

20 mM tiamin oldat (10^3 -szeres):

Tiamin	g
H ₂ O	ml
Sterilizés: szűréssel	
Tárolás felhasználásig: 1 ml-es adagokban -20°C-n.	

4.3. Módszerek

4.3.1. Törzsek fenntartása

Kísérleteinkhez a RE007 (leu1-32 ura4-D18 VprNL4-3::ura4⁺ ade6-M210 h⁻) törzset használtuk, melynek stabil, ura4-es lokuszába egy kópiában a vad típusú Vpr-t kódoló gén van integráltatva. A Vpr gén be és kikapcsolásához egy nmt1-es promótert (no-message in thiamine promoter type 1) használtunk. A táptalaj illetve tápoldat 20 µM-os tiamintartalma biztosította a teljes génrepressziót (98%). Tiamin hozzáadása nélkül készült táptalajok illetve tápoldatokban a vad típusú Vpr-t kódoló gén expresszáldott. Az Sp223-as szülői törzset (leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h⁻) a Vpr represszált állapothoz használtuk kontrollnak. A törzsek Dr. Yuqi Zhao laboratóriumából származnak (Children's Memorial Institute for Education and Research, Northwestern University, Chicago, U.S.A.)

A törzsek fenntartásához 30 °C hőmérsékleten, tiaminnal kiegészített EMM (Moreno et al. 1991) táptalajt használtunk. Előkultúrák készítése 30 °C-on, 200 RPM rázóinkubátorban, EMM tápoldatban történt, 1000 ml-enként 75 mg uracil leucin, valamint 20 µmol tiamin végkoncentrációval.

4.4.2. Sejtmorfológia- és osztódóképesség vizsgálata

Logaritmikus fázisban lévő sejtek egy éjszakás előkultúrát használtunk: 20 µM tiamin tartalmú EMM tápoldatban szaporítva. A kísérletekhez a sejteket háromszor mostuk majd, 2×10^5 sejt/ml kezdeti koncentrációt állítottunk be. Meghatározott időpontokban mintát vettünk, amelyekből sejtsűrűséget határoztunk meg haemocytométerrel, illetve sejtphotokat készítettünk Nikon mikroszkóp és Nomarsky interferometer segítségével.

4.4.3. *S. pombe* törzsek tesztelése oxidatív stressz hatására

H₂O₂ teszt Quinn et al. (2002) módosított módszerét használtuk speciálisan az RE007-es törzsre alkalmazva. 16 órás Vpr expresszálo és represszálo, log fázisú sejteket előre melegített EMM tápoldatba oltottunk 5 x 10⁵ sejt/ml koncentrációban. Adaptív stresszhez 0,15 mM –os H₂O₂-al történő, 1 h előkezelést követően 25 mM végkoncentrációig adtunk H₂O₂-t. Akut stresszhez 25 mM H₂O₂ koncentrációt alkalmaztunk előkezelés nélkül. Meghatározott időpontokban mintát vettünk, amelyet 20 µM tiaminnal kiegészített EMM táptalajra szélesztettünk. 3 illetve 6 napos, 30 °C-on történt inkubálás után képződött telepeket számoltuk meg.

4.4.4. DNS mennyiség és sejtciklus vizsgálatok

Flow citometriás mérésekhez a fent leírt H₂O₂ szenzitivitási tesztet alacsony nitrogéntartalmú (2,5 mM N₂) EMM tápfolyadékban végeztük el újra. Az akut és adaptív stresszkörülményeknek alávetett mintákat etanollal fixáltuk. RNase-kezelés és propidium jodidos festés után flow citometriás méréseket végeztünk a sejtek DNS-tartalmának meghatározására, illetve a sejthossz vizsgálatára. A Masuda et al. (2000) módszerét annyiban módosítottuk a kísérletekhez, hogy log fázisban lévő 16 órás Vpr-expresszálo és Vpr-represszálo előkultúrából oltottuk be az alacsony nitrogéntartalmú (2,5 mM) EMM tápoldatokat.

5. Eredmények

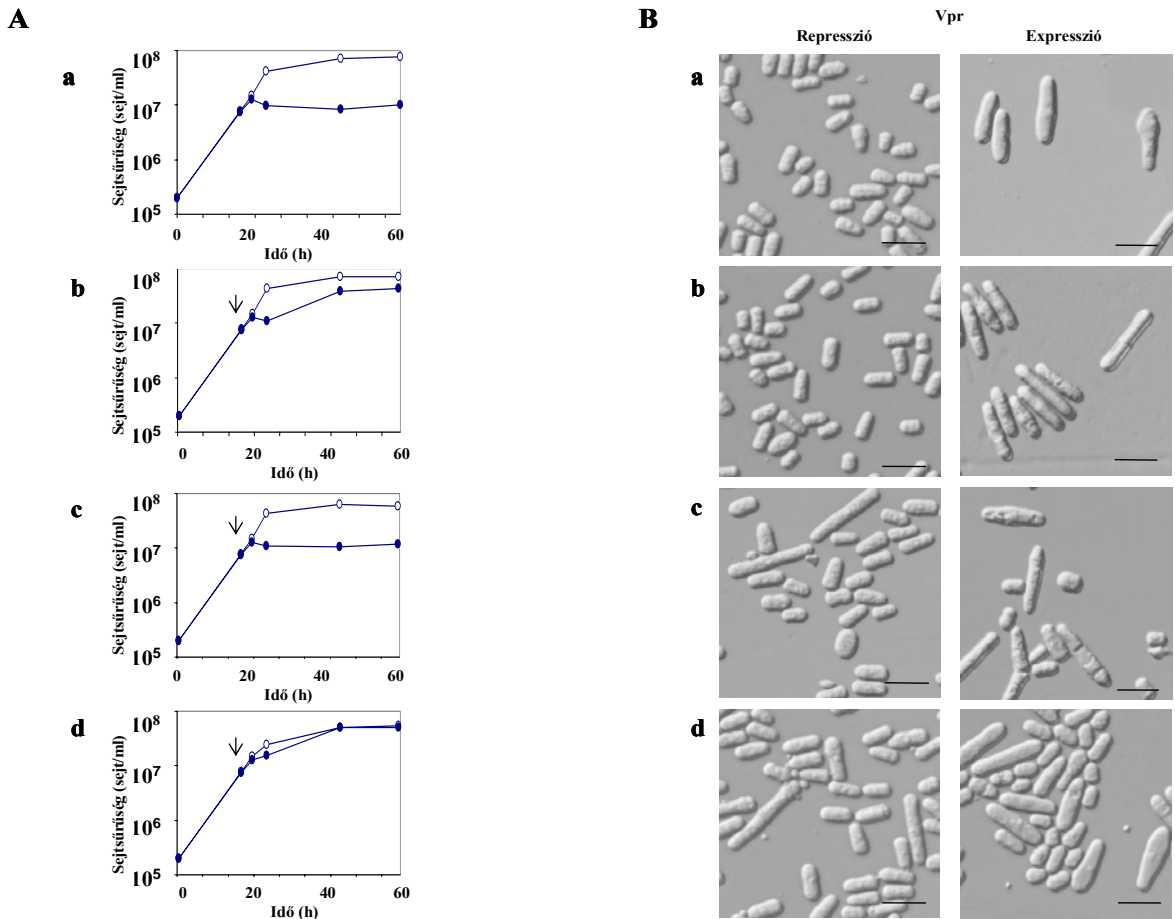
Az nmt1-es „full strength” promóter működése miatt $20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ koncentrációjú tiamin az EMM tápoldatban 98%-os hatékonysággal biztosítja a Vpr represszióját (kikapcsolja az nmt1-es promótert), míg tiamin hiányában a Vpr protein expresszálódik (az nmt1-es promóter bekapcsol). A Vpr indukció hatását a X. ábra A/a, B/a mutatja. A *S. pombe* sejtekben indukált Vpr- expresszió hatására a tiamin-mentes tápközegben történő tenyésztés után mintegy 20 órával szaporodásbeli visszaesés jellemző (X. ábra A/a). Az SP223-as szülői törzs generációs ideje és sejt morfológiája gyakorlatilag azonosnak tekinthető a RE007-es törzsével - Vpr represszált körülmények között. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy tiamin-mentes tápközegben való tenyésztés 16. órája után bekövetkező VprNL4-3 protein indukálódik, hatására a 24. óra után megnyúlt, nem osztódó sejtek (cdc2 fenotípus) jelennek meg és sejtpusztulás tapasztalható (Masuda et al. 2000).

A 16 órás Vpr expresszálo és Vpr represszált kultúrákhoz

- (i) $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ végkoncentrációban tiamint,
- (ii) $0.15 \text{ mmol}/\text{dm}^3 \text{ H}_2\text{O}_2$ -ot
- (iii) $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ tiamint és $0.15 \text{ mmol}/\text{dm}^3 \text{ H}_2\text{O}_2$ -ot

Adtunk (X. ábra A, B).

- (i) Az $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ tiamin hatására a Vpr expresszálo sejtek gyorsabban osztódtak, mint a kezeletlenek (X. ábra A/b), ám ugyanez a kezelés nem okozott változást a sejt morfológiában (X. ábra B/b).
- (ii) $0.15 \text{ mmol}/\text{dm}^3 \text{ H}_2\text{O}_2$ koncentráció nem volt hatással a sejtosztódásra (X. ábra A/c), viszont a Vpr represszált sejtek között 13 %-al megnőtt a megnyúlt sejtek aránya, míg a Vpr indukált sejtek között a megnyúlt sejtek 98 %-ról 43 %-ra csökkent (X. ábra B/c).
- (iii) Az $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ tiamin és $0.15 \text{ mmol}/\text{dm}^3 \text{ H}_2\text{O}_2$ Vpr jelenlétében szinergista hatást fejtett ki a sejtosztódásra (X. ábra A/d). A Vpr-t nem termelő sejtek között a megnyúlt sejtek 13 %-ban voltak jelen, a Vpr proteint termelő sejtek között az elongált sejtek aránya 98 %-ról 25 %-ra csökkent (X. ábra B/d).



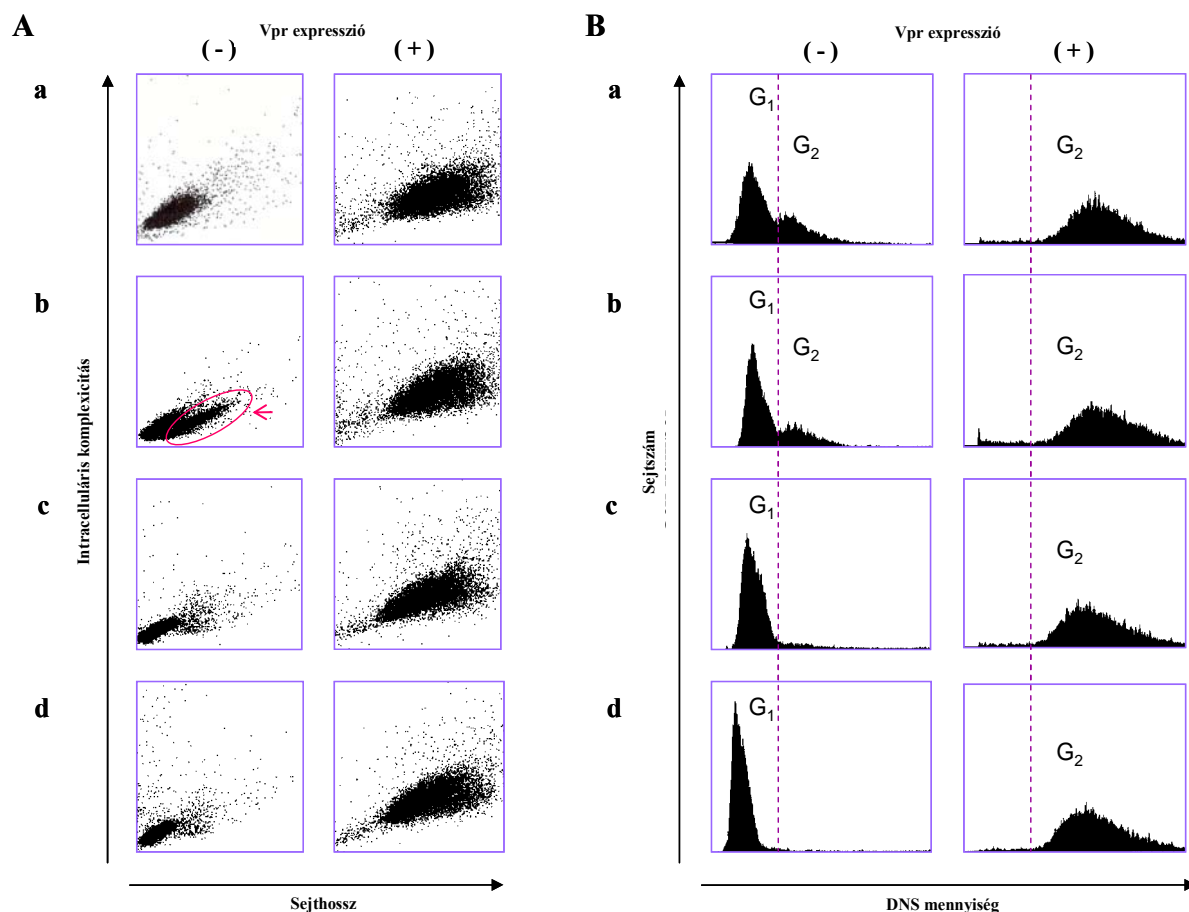
X. ábra: Szaporodási görbék (A) és a sejt morfológiát mutató fotók (B) az *S. pombe* RE007-es törzse látható Vpr expresszázó (●) és nem expresszázó (○) körülmények között, EMM (pH 5.6) tápfolyadékban. A kultúrákat (a nyíl jelölt időpontokban kezeltük). Kezelés nélkül (a), 1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ tiamin hozzáadása (b), 0.15 mmol/dm^3 H_2O_2 (c), és 1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ tiamin + 0.15 mmol/dm^3 H_2O_2 (d) kezelések történtek. Fénymikroszkópos képek 10 μm -es osztás feltüntetésével láthatóak. Az adatok öt kísérlet eredményeit reprezentálják.

Alacsony koncentrációjú (0.15 mmol/dm^3), 1 sejtciklus hosszúságú (4 h) H_2O_2 -os kezelés hatására 15 % megnyúlt sejt jelent meg a Vpr represszált kultúrákban (-) (XI. ábra 2A/b), amelyet a Flow Citometriás módszerekkel is kimutattunk, nyíllal jelölve a XI. ábra A/a ábrán. Az RE00-es törzs Vpr-represszált sejtjeit H_2O_2 -al kezelve a sejt kultúrában megnyúlt sejtek jelennek meg, amelyek később is láthatóak, mint a 28 h-s mintákban (X. ábra B/c). Növekvő intenzitású (adaptív és akut) stressz hatására a ez a megnyúlt sejt populáció eltűnt, és a sejtek nagy többségének csökkent a sejt mérete a kontrollhoz képest (XI. ábra A/c/d), míg a Vpr expresszázó sejtek esetében a H_2O_2 kezelés hatására nem történt látványos sejt méret-változás.

Az egyre növekvő koncentrációjú H_2O_2 kezelés hatására a Vpr represszált (-) kultúrák sejtjei egyre inkább a G_1 fázis felé tolódtak, az akut kezelés esetében már gyakorlatilag csak G_1

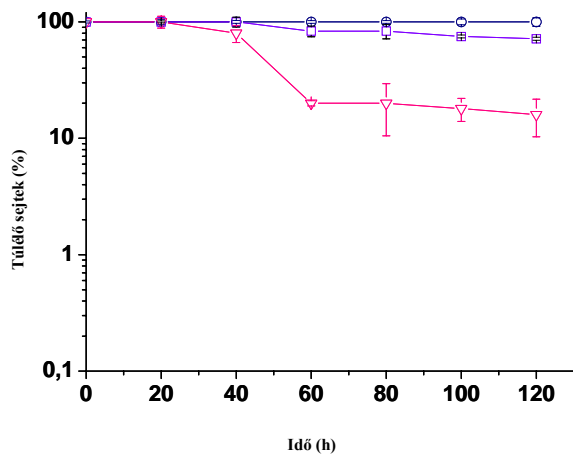
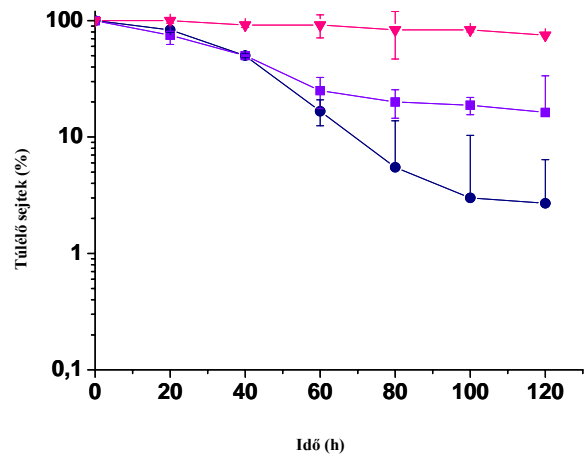
fázisban lévő sejtek láthatóak. A Vpr-t expresszáló kultúrák (+) esetében megmaradt a G₂ fázis egy enyhe eltolódással a G₁ fázis felé (XI. ábra B).

Ezen megfigyelések azt támasztják alá, hogy a H₂O₂ kezelésre adott válaszreakciók nem változtatják meg a sejtciklus-jellemzőket és nem szüntetik meg a sejtosztódás Vpr által indukált megállását G₂ sejtfázisban.



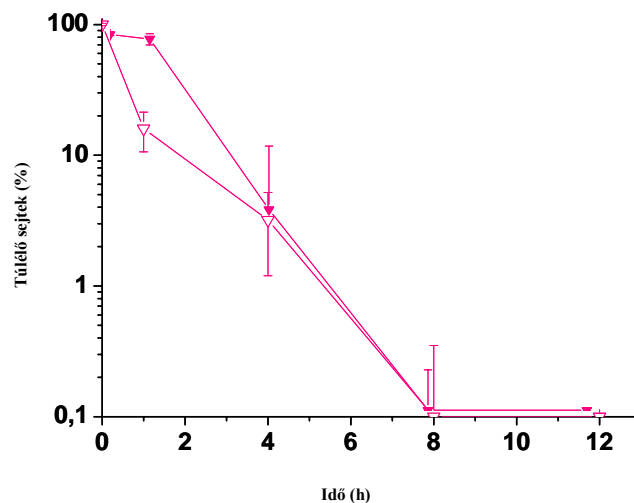
XI. ábra: H₂O₂ kezelés hatása a sejthosszra (A), valamint a sejtek DNS mennyiségére (B) az *S. pombe* RE007-es Vpr-indukált (+) és nem indukált (-) kultúráiban. A/a, B/a. H₂O₂ kezelés nélkül A/b, B/b. Alacsony koncentrációjú, (0.15 mmol/dm³) H₂O₂ kezelés, A/c, B/c. Adaptív stressz (0.15 mmol/dm³ H₂O₂ előkezelés 1 órán át, majd 25 mmol/dm³ H₂O₂) és A/d, B/d Akut stresszválasz (25 mmol/dm³) H₂O₂ hatásai.

A XII. ábra A az adaptív és akut stresszválaszt mutatja. Vpr represszált sejtek esetében az adaptív stressz közel 20 % sejtpusztulást, az akut stressz a sejtek körülbelül 80 %-át pusztítja el 2 órán belül. Vpr expresszáló sejtek esetében

A**B**

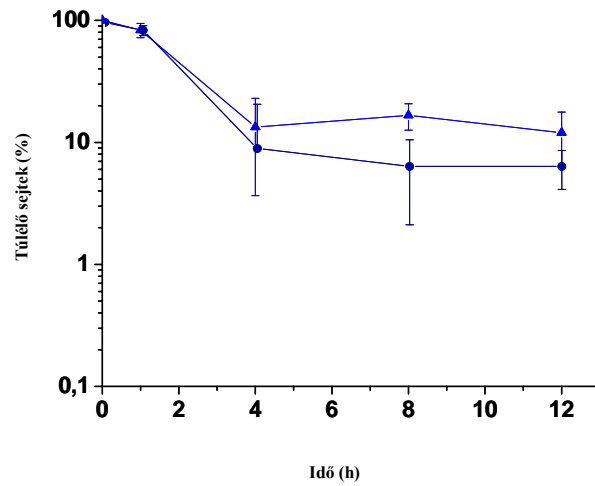
XII. ábra: Oxidatív stressz hatása Vpr represszált (A) és Vpr expresszálo (B) *S. pombe* RE007-es sejtekre adaptív (A: □, B: ■) és akut (A: ▽, B: ▾) körülmények között a kezeletlen mintákhoz viszonyítva (A: ○, B: ●).

Vpr expresszálo sejtek esetében az adaptív stresszválasz 15.8 %-al növelte meg a sejtek túlélését, az akut stressz hatására pedig 80.3 %-al több lett a túlélő sejtek aránya a kezeletlen kultúrához képest (XII. ábra B).



XIII. ábra: Akut stressz hosszútávú hatása Vpr-expresszálo (▾) és Vpr-represszált (▽) Re007-ews *S. pombe* sejtekre

Hosszú távú (12 órás időtartamban vizsgált) akut stresszt követő első sejtciklus alatt (4 h) a Vpr expresszálo sejtek túlélése megnőtt a Vpr represszálo sejtekéhez képest. Akut kezelés hatására a 2.-3. sejtciklust követően a kezelt sejtek elpusztulnak (XIII. ábra).



XIV ábra. Vp-expresszálo *S. pombe* RE007-es sejtek 0.15 mmol/dm³ H₂O₂-al kezelve (▲) és kezelés nélkül (•)

Hosszú távon figyelve az alacsony dózisú (0.15 mmol/dm³) hidrogén-peroxid kezelés hatását azt tapasztaltuk, hogy a a Vpr-expresszálo sejtek túlélése 12-16%-al megnőtt a 2.-4. sejtciklus ideje alatt (XIV. ábra).

6. Diszkusszió

A *S. pombe* sejtekben kifejeződő Vpr fehérje hatását (X. ábra A/a) mutatja. A Vpr indukált sejt kultúrákban körülbelül a 20. órától egy növekedésbeli visszaesés jelenik meg, ami a 16. órától megjelenő Vpr fehérje hatásának eredménye (Masuda et al. 2000). Mivel az RE007-es törzs esetében a duplikációs idő közel 4 órát vesz igénybe, a tenyésztés 20. órájától tapasztalható G₂ sejt ciklus stop, sejt megnyúlás és sejthalál egyértelműen a Vpr protein 16 óra után bekövetkező expressziója miatt következtek be.

Megnyúlt, nem osztódó sejtek (a *cdc2* fenotípus) láthatóak a Vpr indukált kultúrákban a sejt ciklus G₂/M fázisban történő megállásnak köszönhetően (X. ábra B/a). A Vpr-expresszálo sejtek életképessége a génindukció után akár 20 órával adott tiamin hatására is megnőtt. Anélkül, hogy kizárnánk a tiamin hatását a vpr gén expressziójára, azt feltételezzük, hogy az adott tiamin-koncentráció felgyorsította a sejt ciklust, és így a sejtben indukált stresszválasz-reakciókat, a tápközeghez adott tiamin egy bizonyos határig elősegíti a sejt osztódást. A jelenségre egy másik lehetséges válasz a tiamin 'scavenger', gyökfogó aktivitása lehet (Jung and Kim 2003; Gliszczynska-Swiglo 2005).

HIV-1 Vpr fehérje hatására létrejövő G₂/M sejt ciklus stop célfehérjéi a Pp2A (Elder et al. 2002), Hsp 70 (Iordansky et al. 2004) és Hsp 16 (Benko et al. 2004), valamint a klasszikus mitotikus ellenőrzőponttal közös elemei a Wee1, Ppa2, Rad24 (Masuda et al. 2000). A teljes Vpr hatásmechanizmus azonban eddig még ismeretlen, és több elemet, illetve lehetséges útvonalat feltételeznek (Yoshizuka et al. 2005).

A Vpr fehérje és oxidatív stressz kapcsolatáról, és így a Vpr-expresszálo *S. pombe* sejtek oxidatív stresszrel, H₂O₂ -val történő kezeléséről kísérleteink megkezdésekor nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok.

A Vpr-t kifejező sejt kultúrák alacsony koncentrációjú, (0.15 mmol/dm³) hidrogén-peroxid kezelése során azt tapasztaltuk, hogy a megnyúlt sejtek aránya 98 %-ról 43 %-ra csökkent. Míg a Vpr represszálo sejtek esetében ugyanez a kezelés 13 %-al növelte a meghosszabbodott sejtek számát (X. ábra B/c).

A Vpr expresszálo kultúrák esetében ugyanez a hidrogén-peroxidos kezelés a sejtek életképességét megnövelte a kezelést követő első sejt ciklus alatt (XIV. ábra).

A Vpr protein kifejeződése ellenére a megnövekedett túlélést a sejt kultúrák H₂O₂ kezelésének hatására indukálódó stressz-válasz mechanizmusok okozhatták (XII. ábra A) (Quinn et al. 2002). Feltételezésünk szerint a MAPK (mitogen-activated protein kinase) Pap1-es útvonalának aktiválódása vezetett megnövekedett antioxidáns enzimszinthez vezetett, (Toone and Jones 1998,

Wilkinson and Millar 1998, Buck et al. 2001, Quinn et al. 2002), amely a Vpr fehérje mint oxidatív stresszor hatását gyengítette.

A sejtciklus G₂/M fázis határán történő megállása, és az így bekövetkező sejthalál, ami különböző stresszorok (Vpr hatására) létrejön, a Cdc2 molekula foszforiláltsági állapotától függ. A környezet egyensúlyának különböző okokból történő megváltozása, mint például oxidatív stressz, és hő sokk esetén a MAPK útvonal elemeinek aktivációját okozza (Shiozaki et al. 1998; Nguyen and Shiozaki 1999; Taricani et al. 2001; Tekin et al. 2001). Mind az oxidatív stressz, mind a hő sokk elleni védő molekulák a Vpr fehérje célmolekulái között szerepelnek illetve szerepelhetnek. Ezen tények alátámaszthatják azt a hipotézist, miszerint az aktivált MAPK útvonal elemei a HIV-1 es vírus Vpr proteinjének káros hatásai ellen védik a sejteket.

A Vpr expresszáló sejtek az akut, 25 mmol/dm³ H₂O₂ által okozott oxidatív stressz megnövekedett túlélését okozta rövid távon, 2 órás (XII. ábra B) és 4 órás, körülbelül egy sejtciklus idő alatt (XIII. ábra).

Alacsony dózissal, 0.15 mmol/dm³ H₂O₂ hatására a kezelést követő második sejtciklustól (4-16 óra) jellemző a Vpr fehérjét termelő *S. pombe* sejtek túlélésének megnövekedése (XIV. ábra). A hidrogén-peroxidra adott akut stresszválaszért a MAP kinázok Atf1-es útvonalának géjei felelősek, míg az alacsony dózis hatására a Pap1-es útvonal aktiválódik (Quinn et al. 2002).

Az adaptív H₂O₂ kezelés szintén megnövelte a túlélés arányát, ám ez kevésbé volt hatásos, mint az előkezelés nélküli, akut H₂O₂ stressz (XII. ábra B). (Az irodalm csupán 120 percig írja le az akut és adaptív oxidatív stressz hatásait.)

Hosszú távon (12 órán át) vizsgálva az akut H₂O₂ kezelés hatását, a kezelést követő mintegy 2 sejtciklus idővel, 8 órával gyakorlatilag nem tartalmaztak élő sejteket a kultúrák (XIII. ábra), ez az adaptív stressz esetében is igaz volt.

Az eredményeink arra utalnak, hogy a hidrogén-peroxid, mint oxidatív stresszor megvédte a sejteket a Vpr apoptotikus hatása ellen.

H₂O₂ stressz ellen védő mechanizmusok nem szüntették meg a G₂ sejt fázis blokkot, hanem az alatt fejtették ki hatásukat.

Ezen megfigyelések azt támasztják alá, hogy a Vpr fehérje és a H₂O₂ által indukált stressz részben közös hatásmechanizmussal/útvonalon halad, illetve hogy a H₂O₂ megfelelő dózisaival által indukált védekező mechanizmusok képesek felfüggeszteni a Vpr sejtölő hatását (XII. ábra A-B).

Az eredményeink azt mutatják, hogy a hidrogén peroxid kezelés által okozott stressz megfelelő dózisaival hatására a kezelést követő 1.-4. sejtciklusban a megváltozott intracelluláris fiziológiai illetve gén-indukció belső változások a Vpr expresszáló *S. pombe* sejtek túlélését segítette.

Az oxidatív stressz megfelelő dózisaival indukálható gén-expresszió termékei feltételezhetően a HIV-1 Vpr protein inhibitoraiként működnek.

Bár a korábbi irodalmi adatok szerint a HIV-1 Vpr nem hat a MAPK útvonalra, egy friss tanulmány szerint a vad típusú Vpr fehérje túltermelése a MAP2K2 (MEK2), valamint a MKNK2 kaszkádok több génjét felül- és alulregulálja (Yoshizuka et al. 2005).

Eredményeink a Vpr fehérje hatására létrejövő intracelluláris oxidatív stresszfolyamatok hatásának és kivédésének fontosságára hívják fel a figyelmet. Következtetéseink a Vpr HIV patogenezisében játszott szerepére irányíthatják rá a figyelmet és a betegség kezelésének újfajta szemléletének kialakításához járulhatnak hozzá.

7. Függelék

7.1. Rövidítések jegyzéke

HIV-1 Vpr	human immunodeficiency virus type-1 viral protein R
MAPK	mitogén-aktivált protein kinázok
MAP2K2 (MEK2)	mitogén-aktivált protein kináz kináz 2
MKNK2	MAP kináz kötő szerin/threonin kináz 2
Vpr NL4-3	vad típusú Vpr
nmt1	'no-message thiamine' promóter 1
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
H ₂ O ₂	hidrogén peroxid

7.2. Irodalomjegyzék

Altfeld M., Addo M.M., Eldridge R.L., Yu X.G., Thomas S., Khatri A., Strick D., Phillips M.N., Cohen G.B., Islam S.A., Kalams S.A., Brander C., Goulder P.J.R., Rosenberg E.S., Walker B.D. and the HIV Study Collaboration (2001): Vpr is preferentially targeted by CTL during HIV-1 infection. *J. Immunol.* **167.**, 2743-2752

Arien K.K., Troyer R.M., Gali Y., Colenbunders R.L., Arts E.J.P. and Vanham G. (2005): Replicative fitness of historical and recent HIV-1 isolates suggest HIV-1 attenuation over time. *AIDS.* **19**, 1555-1564

Basanez G. and Zimmerberg J. (2001): HIV and Apoptosis: Death and the Mitochondrion. *J. Exp. Med.* **193**, 11-14

Benko Z., Liang D., Agbottah E., Hou J., Ciu K., Yu M., Innis S., Reed P., Kabat W., Elder R.T., Di Marzio P., Taricani L., Ratner L., Young P.G., Burinsky M. and Zhao Y. (2004): Anti-Vpr activity of a yeast chaperone protein. *J. Virol.*, **78**, 11016–11029

Buck V., Quinn J., Pino T.S., Martin H., Salhadna J., Makino K., Morgan B.A. and Millar J.B.A. (2001): Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 407-419

Chen D., Toone W.M., Mata J., Lyne R., Burns G., Kivinen K., Brazma A., Jones N. and Bahler J. (2003): Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 214-229

Chen M., Elder R.T., Yu M., O’Gorman M.G., Selig L, Bernarous R., Yamamoto A. and Zhao Y. (1999): Mutational analysis of Vpr-induced G₂ arrest, nuclear localization, and cell death in fission yeast. *J. Virol.* **73**, 3236-3245

Chládková K., Hendrych T., Gásková D., Goroncy-Bermes P. and Siegler K. (2004): Effect of biocides on *S. cerevisiae*: Relationship between short-term membrane affliction and long-term cell killing. *Folia Microbiol.* **49**, 718-725

Elder R.T., Benko Z. and Zhao Y. (2002): HIV-1 Vpr modulates cell cycle transition through an alternative cellular mechanism other than the classic mitotic checkpoints. *Front. Biosci.* **7**, 349-357

Elder R.T., Yu M., Chen M., Zhu X., Yanagida M. and Zhao Y. (2001): HIV-1 Vpr induces cell cycle G₂ arrest in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) through a pathway involving regulatory and catalytic subunits of PP2A and acting on both Wee1 and Cdc25. *Virology*, **287**, 359-370

Fauci A.S., Pantaleo G., Stanley S. and Weissman D. (1996): Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann. Med. Interne*, **124**, 654

Frankhauser H., Zurlinden A., Schweingruber A.M., Edenharter E. and Schweingruber M.E. (1995): *Schizosaccharomyces pombe* thiamine pyrophosphokinase is encoded by gene *tnr3* and is a regulator of thiamine metabolism, phosphate metabolism, mating, and growth. *J. Biol. Chem.* **47**, 28457-28462

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

Gille G., Siegler K. and Hofer M. (1993): Response of catalase activity and membrane fluidity of aerobically grown *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* to aeration and the presence of substrates. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **139**, 1627-1634

Gliszczynska-Swiglo A. (2005): Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chem.*

Iordansky S., Zhao Y., Dubrovsky L., Iordanskaya T., Chen M., Liang D. and Bukrinsky M. (2004): Heat shock protein 70 protects cells from cell cycle arrest and apoptosis induced by Human Immunodeficiency Virus type 1 Viral protein R. *J. Virol.* **78**, 9697-9704

Jung I.L. and Kim I.G. (2003): Thiamine protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. *Environ. Toxicol. Phar.* **15**, 19-26

Kim T.A., Avraham H.K., Koh Y.H., Jiang S., Park, A. (2003): HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* **170**, 2629-2637

Kurzweilová H., Siegler K. (1993): Factors affecting the susceptibility of sensitive yeast cells to killer toxin K1. *Folia Microbiol.* **38**, 524-526

Lachgar A., Sojic N., Arbault S., Bruce D., Sarasin A., Amatore C., Bizzini B., Zagury D. and Vuillaume M. (1999): Amplification of the inflammatory cellular redox state by Human Immunodeficiency Virus type-1 immunorepressive Tat and gp120 proteins. *J. Virol.* **73**, 1447-1452

Masuda M., Nagai Y., Oshima N., Tanaka K., Murakami H., Igarshi H. and Okayama H. (2000): Genetic studies with the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* suggest involvement of Wee1, Ppa2, and Rad24 in induction of cell cycle arrest by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr. *J. Virol.* **74**, 2636-2646

Moreno S., Klar A. and Nurse P. (1991): Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Method. Enzymol.* **194**, 795-823

Muthumani R., Hwang D.S., Desai B.M., Zhang D., Dayes N., Greent D.R. and Weiner D.B. (2002): HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 37820-37831

Nguyen A.N. and Shiozaki K. (1999): Heat shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev.* **13**, 1653-1663

Pantaleo G., Graziosi C., Demarest J.F., Butini L., Montroni M., Fox C.H., Orenstein J.M., Kotler D.P. and Fauci A.S. (1993): HIV-1 infection is active and progressive during the clinically latent period of infection. *Nature.* **362**, 355-358

Perl A. and Banki K. (2000): Genetic and metabolic control of the mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate production in HIV disease. *Redox Signaling*. **2**, 551-573

Pócsi I., Prade R.A. and Penninckx M.J. (2004): Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **49**, 1-76

Poon B. and Chen I.S.Y. (2003): Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr enhances expression form unintegrated HIV-1 DNA. *J. Virol.* **77**, 3962-3972

Price D.A., Brenchley J.M., Ruff L.E., Betts M.R., Hill B.J., Roederer M., Koup R.A., Migueles S.A., Gostick E., Wooldridge L., Sewell A.K., Connors M. and Duek D.C. (2005): Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J. Exp. Med.* **202**, 1349-1361

Quinn J., Findlay V.J., Dawson K., Millar J.B., Jones N., Morgan B.A. and Toone M. (2002): Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 805-816

Raspor P., Plesnicar S., Gazdag Z., Pesti M., Miklavcic M., Lah B., Logar-Marinsek R. and Poljsak B. (2005): Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). *Cell. Biol. Int.*, **29**, 57-63

Shiozaki K., Shiozaki M. and Russell P. (1998): Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 1339-1349

Sies H. (1993): Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**, 213-219

Stark L.A. and Hay R.T. (1998): Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Viral Protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription. *J. Virol.* **72**, 3037-3044

Taricani L., Feilolter H.E., Weaver C. and Young P.G. (2001): Expression of Hsp 16 in response to nucleotide depletion is regulated via the Spc1 MAPK pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acids Res.* **29**, 3030-3040

Tekin D., Xi L., Zhao T., Tejero-Taldo M.I., Atluri S. and Kukeja C. (2001): Mitogen-activated protein kinases mediate heat shock-induced delayed protection in mouse heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**, 523-532

Toone W.M. and Jones N. (1998): Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes to Cells.* **3**, 485-498

Tungaturthi P.K., Sawaya B.E., Singh S.P., Tomkowicz B., Ayyavoo V., Khalili K., Collman R.G., Amini S. and Srinivasan A. (2003): Role of HIV-1 Vpr in AIDS pathogenesis: relevance and implications of intravirion, intracellular and free Vpr. *Biomed Pharmacother.* **57**, 20-24

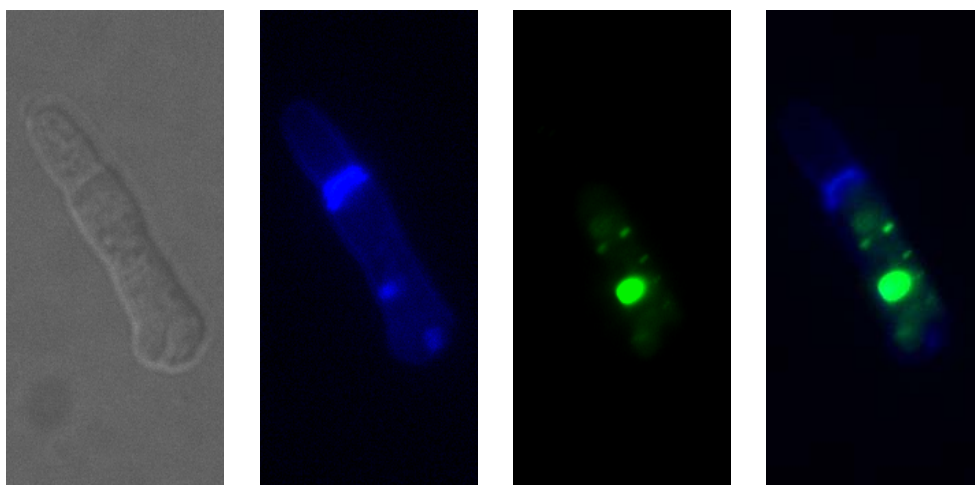
Valyi-Nagy T. and Dermody T.S. (2005): Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infection of the nervous system. *Histol. Histopathol.* **20**, 957-967

Wilkinson M.G. and Millar J.B.A. (1998): SAPKs and transcription factors do the nucleoplasmic tango. *Genes Dev.* **12**, 1391-1397

Yoshizuka N., Yoshizuka-Chadani Y., Krishnan V. and Zeichner S. (2005): Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-dependent cell cycle arrest through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Virol.* **79**, 11366-11381

Zhu Y., Gelbard H.A., Roshal M., Pursell S., Jamieson B.D. and Planelles V. (2001): Comparison of cell cycle arrest, transactivation, and apoptosis induced by the simian immunodeficiency virus SIVagm and human immunodeficiency virus type 1 vpr genes. *J. Virol.* **75**, 3791-3801

**BYDLV MP vírusdeterminánsának hatása a hasasadó élesztő
sejtciklusára és osztódási sajátosságaira**



1. Bevezetés

A barley yellow dwarf vírus (BYDV) a világ gabonaföldjeit súlytó kórokozó. A BYDV fertőzés korai stádiumát a növények retardált/megakadt fejlődése jellemzi, amely a későbbiekben terméskieséshez vezet, és így nagymértékű gazdasági károkat okoz.

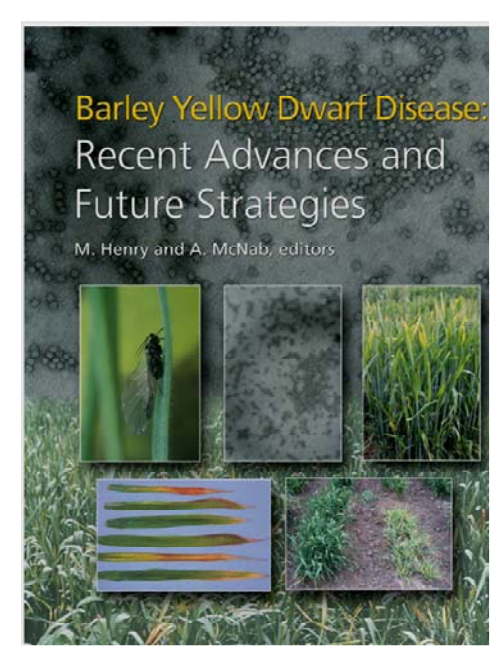
Egyes vírusok által kódolt fehérjék nagyban hozzájárulnak a fertőzés eredményességéhez, illetve súlyosságához. Ebben a tanulmányban a BYDV MP vírusdeterminánsának a vírusfertőzés során betöltött lehetséges szerepét vizsgáltuk, mivel a korábban megjelent szakirodalom nem szolgáltat adatokkal erről. Bizonyítékkal szolgálunk arra nézve, hogy a MP gátolja a sejtosztódást, és sejtmegnyúlást okoz. Mivel az in vitro fehérjevizsgálatok a Movement Protein és egyéb fehérjék kötését vizsgálták nem vezettek eredményre, ezért a MP hatását in vivo, hasadó élesztő modellen vizsgáltuk genetikai analízis segítségével.

Az *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő modellen kapott eredményeinket a transzgenikus *Arabidopsis thaliana* növényekkel kapott vizsgálatok is megerősítették. Ezért a Movement Protein virális determinánssal végzett élesztőmodellen végzett kísérletek a továbbiakban is biztonsággal alkalmazhatóak a vírusfehérjék kutatásában.

2. Irodalmi áttekintés

A barley yellow dwarf vírus (BYDV) a Lueoviridae genuszba tartozik (Smith et al. 1999) és az egyik legkártékonyabb vírusos járvány, amely a gabonaféléket súlytja (Miller and Rasochova 1997). Ez a vírusos fertőzés világszerte elterjed Ázsiában, Ausztráliában, Afrikában, Kanadában, Európában, Új-Zélandon, dél-Amerikában és az U.S.A.-ban.

A vírust egyes rovarok és azok lárváinak szívogató tevékenysége terjeszti a gazdanövények között, amelyek búza, árpa és zab egyaránt lehetnek (Chay et al. 1996). A BYDV fertőzés első jelei a növény növekedésének visszaesése és sárgás, vagy vöröses-lilás elszíneződése (I.ábra).



I. ábra. A BYDV fertőzés fő jellemzői

A vírus fertőzésének későbbi gazdasági következmények jelentkeznek a betegség által okozott termés kiesés miatt.

Mivel a betegség terjesztéséért felelős rovarok tevékenysége nehezen megjósolható, ezért a vírus terjedésének befolyásolása nem sok gyakorlatban is alkalmazható lehetőséget ad a szakembereknek. A betegség elleni védekezés nem kellően hatásos, praktikus és nem gazdaságos.

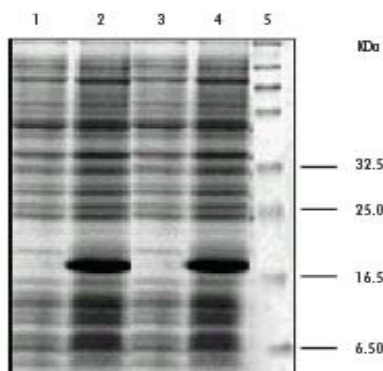
A célunk a BYDV virális determinánsainak azonosítása volt, és több virális protein vizsgálatával kiválasztani azt, amelyik a legfontosabb sejtfunkciókat érinti, így módon felelős lehet a vírus fertőzőképességéért, illetve a növények növekedésének visszamaradásáért (Ziegler-Graff et al. 1996; Nass et al. 1998).

Mivel növényi sejt kultúrákon vizsgálni ezen funkciókat igen költséges és nehézkes technológiai megoldásokat igényel, ezért hasadó élesztő (*Schizosaccharomyces pombe*) rendszert dolgoztunk ki a kísérletekhez. A *S. pombe* funkcionális screenelésének eredményeit ezután növényi modellekre lehet alkalmazni.

A hasadó élesztő eukarióta egysejtű organizmus, amely sok, magasabbrendű eukariótákkal megegyező molekuláris és biokémiai jellegzetességet mutat (Zhao and Liebermann 1995). *S. pombe* modellorganizmus használata eukarióta gének funkciójának meghatározásához (Lee and Nurse 1997; Al-Khodairy et al. 1992; Zhao et al. 1996). Mivel a *S. pombe*-t sejtfallal rendelkező eukarióta szervezet, ezen tulajdonságai alapvetően alkalmassá teszik növényekkel kapcsolatos kutatások modellezésére.

2.1. A barley yellow dwarf vírus (BYDV)

A BYDV egy (+) szálú RNS örökítőanyaggal rendelkező luteovírus, amelynek kisméretű, mindössze 5.673 kb hosszúságú genomja van, amely egy virion, és hat nem virion fehérjét kódol (P1-P6) (Mayo et al. 1996). Hasadó élesztő modell segítségével ebben a projektben egyet vizsgáltunk a hat, virion fehérjét kódoló ORF közül.

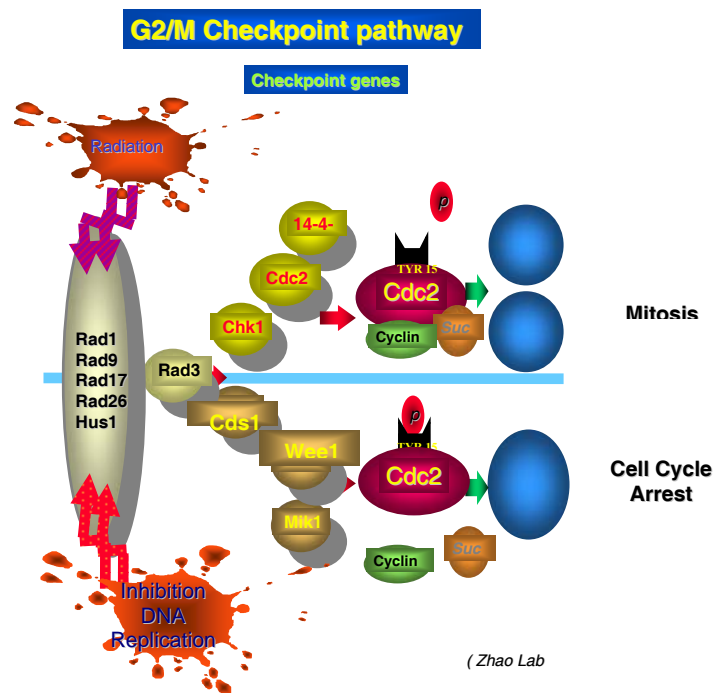


II. ábraA BYDV MP túltermelése után futtatott fehérje-profil

A 4-es számú ORF által kódolt movement protein (MP) egy 17 kD nagyságú fehérje (II.ábra), amely lehetséges vírusdeterminánsként lett azonosítva, amely a BYDV fertőzés során a fertőzött növények törpe növekedését okozhatja.

2.2. Stresszhatások következményei génexpresszióra és sejtciklus változásaira

Az eukarióta sejtek védekező mechanizmusaik révén igyekeznek megőrizni genetikai információjuk érintetlenségét (Enoch and Nurse 1990). Káros környezeti hatásokra, mint például különböző sugárzások, vagy egyéb mutagenizáló ágensek, egyes géntermékek foszforilációs kaszkádja indul el (Boddy et al. 1998; Rhind and Russell 1998).



III ábra. A hasadó élesztő lefontosabb sejtciklust szabályozó foszforilációs útvonalat ábrázolja, amelynek fő elemei konzervatívák az eukarióta sejtekben (Lee and Nurse 1998).

A központi- vagy kulcsmolekula a Cdc2 (III.ábra). A Cdc2 foszforilációs állapota eldöntheti, hogy az adott sejt tovább osztódik-e vagy sem (Gould and Nurse 1989; Norbury et al. 1991; Hayles and Nurse 1995; Morgan 1995; Zeng et al. 1998).

A defoszforilált Cdc2 fehérje ciklin B-t és szukcinát 1-et köt meg és bekövetkezik a mitózis (Lundgren et al. 1991). Ha azonban a Cdc2 molekula foszforilált állapotba kerül a sejtosztódás, a további szaporodás megáll és sejtciklus stop jön létre (Nurse et al. 1976; Macneil et al. 1991; Elder et al. 2000).

3. Célkitűzés

A barley yellow dwarf vírus (BYDV) fertőzése jellemzően kis növésű, törpe növényeket ('dwarf plants') eredményez, amely arra utalhat, hogy ez a vírus a sejtproliferácót negatívan befolyásolja. Korábbi kutatások megerősítették, hogy a BYDV által kódolt Movement Protein (MP) meggátolja a sejtosztódást és sejtciklus G_2 stopot okoz hasadó élesztő sjtékben. Kutatási programunk célja a MP által indukált G_2 arrest molekuláris megchanimzmusának megértése volt *Schizosaccharomyces pombe* modell használatával.

A Movement Protein expressziója hasadó élesztőben a Cdc2-es molekula hiperfoszforilációját okozza, amely állapotban ez a kináz molekula az eukaróta sejtek mitózisának lefolyásáért felelős. Miután a Cdc2 foszforilációját a Wee1-es kináz (Parker et al. 1993) illetve a Cdc25 foszfatáz kontrollálja, a MP által okozott Cdc2 foszforiláció vagy a Cdc25 gátlásán, vagy a Wee1-es molekula funkciójának segítségével hat (Kovelmann and Russel 1996; Furnari et al. 1997; Furnari et al. 1999). Ezt alátámasztva azt találtuk, hogy a wee1-50-es mutáció blokkolta a Movement Protein által indukált sejtosztódási stopot. A wee1-50 dmik1 mutáns Cdc25 foszfatáz aktivitását megvizsgálva arra az eredményre jutottunk, hogy a MP-nek nincs közvetlen hatása a Cdc25-ös enzim működésére. Miután a DNS károsodására illetve a DNS replikációjának gátlására indukálódó útvonalak kulcsmolekulája egyaránt a Cdc2, a Movement Protein valószínűleg ezen mechanizmusok valamelyikére hathat. Sem a korai (rad3), sem a késői (chk1, cds1, vagy chk1/cds1), sem a checkpoint mutánsok genetikai háttere nem befolyásolta a MP hatását a sejtekre, a MP hatására megnyúlt sejtek jelenléte részben a G_2 -es sejtciklusgátlásra utal.

A Δ ppe1 mutáns, amely a PP2A-like enzimet kódoló régióban sérült, és amely a sejtosztódás során az utódsejtekbe jutó kromoszómák egyenlő eloszlásáért felelős (Minshull et al. 1996; Wang et al. 1997; Goshima et al. 2003)., úgyszintén teszteltük a MP expresszió hatását. A Movement Protein által okozott mitotikus abnormalitások ezen a *S. pombe* törzsön egyáltalán nem jeletek meg, sőt emellett egészséges szaporodási képességet mutatott.

Az általunk kapott eredmények arra utalnak, hogy a Movement Protein által okozott G_2 -es sejtciklusgátlás nem közvetlenül a DNS replikációs vagy károsodására aktiválódó útvonalakon keresztül hat, hanem egy ettől független mechanizmuson keresztül, amely magában foglalja a Wee1 és a PP2A-like enzimet kódoló Ppe1-t.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Élesztőtörzsek, plazmidok

A BYDV movement protein hatásának vizsgálatára *S. pombe* sejtek alapfunkcióit érintő vizsgálatára egy genetikai analízisen alapuló modellrendszert dolgoztunk ki (Masuda et al. 2000). A BYDV movement proteinjét kódoló gént egy nmt1-es (no message in thiamine) promóter (Maundrell 1993; Zhao 1998) által indukálható PYZ1N, ura4-, illetve PYZ3N, leu2- szelekciós expressziós vektorba klónoztuk. A PYZ3N vektor a PYZ1N-el teljesen megegyezett azzal a különbséggel, hogy az insert mellett GFP (green fluorescent protein)-t kódolt. Így a kívánt gén lokációját az termelődött fehérje N-terminális végéhez kötött GFP, valamint a megfelelő mikroszkóp segítségével követhettük nyomon a sejtekben.

A MP expresszáshoz tiamin-mentes táptalajt használtunk, a MP represszáshoz 20 μ M végkoncentrációban adtunk tiamint a tápközeghez (Maundrell 1993, Zhao et al. 1996, Zhao et al. 1998).

A disszertációban használt *S. pombe* törzseket az **I. táblázat** tartalmazza:

Törzs	Expresszált gén	Marker	Megjegyzés/Eredet
Sp223	-	AUL	Dr. Benkő Zs.
Cdc2 F15	-	AL	Dr. R. Elder
Δ pep1	-	AU	Dr. Benkő Zs.
Sp223(PYZ1N)	-	AL	-
Sp223(PYZ1N-MP)	MP	AL	-
Sp223(PYZ3N-MP)	MP-GFP	AL	-
Chk1(PYZ1N)	-	A	-
Chk1(PYZ1N-MP)	MP	A	-
Chk1(PYZ3N-MP)	MP-GFP	A	-
Cds1(PYZ1N)	-	A	-

Törzs	Expresszált gén	Marker	Megjegyzés/Eredet
Sp223	-	AUL	Dr. Benkő Zs.
Cdc2 F15	-	AL	Dr. R. Elder
Δpab1	-	AU	Dr. Benkő Zs.
Sp223(PYZ1N)	-	AL	-
Sp223(PYZ1N-MP)	MP	AL	-
Sp223(PYZ3N-MP)	MP-GFP	AL	-
Chk1(PYZ1N)	-	A	-
Chk1(PYZ1N-MP)	MP	A	-
Chk1(PYZ3N-MP)	MP-GFP	A	-
Cds1(PYZ1N)	-	A	-
Cds1(PYZ1N-MP)	MP	A	-
Cds1(PYZ3N-MP)	MP-GFP	A	-
Chk1::cds1(PYZ1N)	-	A	-
Chk1::cds1(PYZ1N-MP)	MP	A	-
Chk1::cds1(PYZ3N-MP)	MP-GFP	A	-
Rad3-139(PYZ1N)	-	AL	-
Rad3-139(PYZ1N-MP)	MP	AL	-
Rad3-139(PYZ3N-MP)	MP-GFP	AL	-
ΔPab1(PYZ1N)	-	AL	Kis sejtméret, lassú növekedés
ΔPab1(PYZ1N-MP)	MP	AL	Kis sejtméret, lassú növekedés
ΔPab1(PYZ3N-MP)	MP-GFP	AL	Kis sejtméret, lassú növekedés
ΔPpa2(PYZ1N)	-	AL	-
ΔPpa2(PYZ1N-MP)	MP	AL	-
ΔPpa2(PYZ3N-MP)	MP-GFP	AL	-

Törzs	Expresszált gén	Marker	Megjegyzés/Eredet
Δ Ppe1(PYZ1N)	-	A	-
Δ Ppe1(PYZ1N-MP)	MP	A	-
Δ Ppe1(PYZ3N-MP)	MP-GFP	A	-
Wee1-50(PYZ1N-MP)	MP	AL	-
Wee1-50(PYZ3N-MP)	MP-GFP	AL	-
Wee1-50 Δ mik1(PYZ1N)	-	AL	-
Wee1-50 Δ mik1(PYZ1N-MP)	MP	AL	-
Wee1-50 Δ mik1(PYZ3N-MP)	MP-GFP	AL	-
Cdc2-1w(PYZ2N)	-	A	-
Cdc2-1w(PYZ2N-MP)	MP	A	-
Cdc2-1w(PYZ4N-MP)	MP-GFP	A	-
Cdc2-3w(PYZ2N)	-	A	-
Cdc2-3w(PYZ2N-MP)	MP	A	-
Cdc2-3w(PYZ4N-MP)	MP-GFP	A	-
Sp223(pYZ2N)	-	AU	-
Sp223(pYZ2N-MP)	MP	AU	*
Cdc2F15(pYZ2N)	-	A	-
Cdc2F15(pYZ2N-MP)	MP	A	*

* A génexpresszió alacsony szintje miatt további vizsgálatokhoz nem használható.

II. táblázat: A felhasznált plazmidok:

Plazmid név	Inzert	Marker
YZ1N1	-	Ura, Amp
YZ3N	GFP	Ura, Amp
YZ1N1-MP	MP	Ura, Amp
YZ3N-MP	MP-GFP	Ura, Amp
pYZ2N	-	Leu, Amp
pYZ4N	GFP	Leu, Amp
pYZ2N-MP	MP	Leu, Amp
pYZ4N-MP	MP-GFP	Leu, Amp

Az inszertek szekvenálásához használt primereket az IDT-től rendeltük 25 nm-os mennyiségben. A szekvenálási reakciókat csupán a 3' primerrel végeztük, mivel az 5' primer tervezésekor nem vettük figyelembe, hogy az a PYZ1N és PYZ1N1 vektorokon több helyre is beköthet.

A dolgozatban használt primereket a **III. táblázat** tartalmazza:

Name	Target	Base
3'primer for seq. MP	MP	5'-ATATGGATCCTCACCGTACTCTCCCGGATT-3'
5'primer MP	MP	5'-TCAACGACCTTAAGGCCAAC-3'

4.2. Táptalajok, oldatok

A tápanyagkiegészítő vegyületeket a Spektrum 3D gyártmányai. A szilárd táptalajokhoz Oxoid agart használtunk.

YEA (1000 ml)

élesztőkivonat (0.5%)	5 g
glükóz (3%)	30 g
agar (2%)	20 g
Lizin	100 mg
Leucin	150 mg
Uracil	100 mg

EMM (Edinburgh Minimal Medium) (1000 ml)

D-glükóz	20g
K ⁺ ftalát	3 g
Na ₂ HPO ₄	2,2 g
NH ₄ Cl	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,014 g
KCl	1 g
Na ₂ SO ₄	0,040 g
+EMM vitamin oldat	1 ml
+EMM nyomelem oldat	0,1 ml
Ade	250 mg/l
Leu	250 mg/l
Ura	250 mg/l
(Nurse 'Fission Yeast Handbook' szerint)	
Agar	17 g

Limitált nitrogén tartalmú (2,5 mM) EMM (1000 ml)

D-glükóz	20g
K ⁺ ftalát	3 g
Na ₂ HPO ₄	2,2 g
NH ₄ Cl	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,014 g
KCl	1 g
Na ₂ SO ₄	0,040 g
+EMM vitamin oldat	1 ml
+EMM nyomelem oldat	0,1 ml
Ade	250 mg/l
Leu	250 mg/l
Ura	250 mg/l
Agar	17 g
pH	5.8

EMM vitamin oldat 500 ml (10³-szeres) :

Pantoténsav	1 g
Nikotinsav	10 g
Inositol	10 g
Biotin	1 g

EMM nyomelem oldat 500ml (10⁴-szeres):

H ₃ BO ₃	2,5 g
MnSO ₄ .H ₂ O	2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2 g
FeCl ₂ .6H ₂ O	1 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,02 g
KI	0,5 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,2 g
Citromsav	0,5 g

20 mM tiamin oldat (10³-szeres):

Tiamin	0,1066 g
H ₂ O	20 ml

Sterilezés: szűréssel

Tárolás felhasználásig: 1 ml-es adagokban -20°C-n.

1.2 M szorbitol oldat (100ml)

Szorbitol	21,86 g
H ₂ O	100 ml

Sterilezés: szűréssel

Tárolás felhasználásig: 4°C-n.

Ripa puffer (100 ml)

Tris	790 mg
NaCl	900 mg
NP-40 (10%)	10 ml
Na-deoxicholate (10%)	2.5 ml
EDTA (100 mM)	1 ml
pH	7.4

Tárolás felhasználásig: 1 ml-es adagokban -20- illetve -80°C-n.

Felhasználás előtt leupeptin, apoprotin vagy pepstatin (végkoncentráció: 1 mg/ml), illetve aktivált Na_3VO_4 (végkoncentráció: 1mM) hozzáadása szükséges.

4.3. Módszerek

4.3.1. Törzsek fenntartása

Az *S. pombe* törzsekből előkultúrát készítettünk EMM tápoldatban 20 μ M tiamin végkoncentrációval. Az nmt1-es promóteren keresztül a MP represszált volt (Maundrell 1993; Zhao et al. 1996; Zhao et al. 1998). A hasadó élesztő törzseket 200 rpm fordulatszámon, 30 °C-on rázattuk, kivéve a hőmérséklet-érzékeny Wee1-50 és Wee1-50 Δ mik1 mutánsokat, melyeket 25 °C-on tenyésztettünk.

Szilárd táptalajon 3-5 napig, egyes kolóniák megjelenéséig inkubáltuk a törzseket 30-, illetve 25 °C-on.

4.3.2. Molekuláris biológiai módszerek

A BYDV MP génjét hasadó élesztő expressziós pYZ1N, pYZ3N és pYZ2N illetve pYZ4N vektorokba klónoztuk (Zhao et al. 1998). Ezek a vektorok egy indukálható nmt1-es (no message in thiamine) promótert tartalmaznak, amely az inzertált gén expresszióját illetve represszióját tiamin hiányában illetve jelenlétében biztosítja (Maundrell 1993). A MP génjének vektorba klónozását követően *E. coliba* transzformáltuk, majd az egyes telepek felszaporítása után a plazmid DNS-t kivonva restriktációs emésztéssel valamint PCR reakcióval ellenőriztük. A klónozott MP pontos szekvenciáját automata szekvenáló berendezés segítségével (ABI 377) határoztuk meg és hasonlítottuk össze az eredetivel.

A *S. pombe* sejtekben a MP lokalizációjának mikroszkópos vizsgálatához pYZ3 illetve pYZ4N expressziós vektorokba klónoztuk a movement proteint kódoló szekvenciát. A vektorokról a MP bGFP (bright green fluorescent protein) fúzióval fejeződött ki.

4.3.3. Transzformálás és a transzformált *S. pombe* törzsek tesztelése

A hasadó élesztő törzsek transzformálásához BTX Electro Cell Manipulator ECM 600-as készüléket használtunk és a transzformálást a gyártó utasításai alapján végeztük el. A sejteket YEA tápoldatban stacioner fázisig tenyésztettük. Centrifugálás után a sejteket háromszor átmostuk jéghideg 1.2 M szorbitollal, majd az utolsó mosást követően 2×10^8 sejtet szuszpendáltunk fel a szorbitol oldatban, 200 μ l-es adagokban. Az elektroporációt a gyártó által javasolt küvettában és paraméterekkel, 2.25 kV-on végeztük, majd azonnal 0.5 ml jéghideg, 1.2 M-os szorbitolt adtunk a sejtekhez. Centrifugálás után 50 μ l-nyi térfogatot szélesztettünk szelektív minimál táptalajra. 4-6 nap (30 °C - illetve egyes hőmérséklet-érzékeny mutánsok esetében - 25 °C-n történt) inkubálás után 4-4 transzformált *S. pombe* telepet izoláltunk. Mindegyiket teszteltük MP expresszált illetve MP represszált állapotban szilárd táptalaj felszínén, illetve tápfolyadékban mutatott növekedési sajátosságokra, sejt morfológiára. A további vizsgálatokhoz egy olyan transzformált *S. pombe* törzset választottunk ki, amely a többségében jellemző tulajdonságokat mutatta.

4.3.4. Gén-indukció az *S. pombe* törzseknél

A MP indukciót megelőzően a MP represszált sejt kultúrákat 20 μ M tiamin jelenlétében késői log fázisig növesztettük tápoldatban. A sejteket centrifugáltuk, majd háromszor desztillált vízben mostuk, ezt követően tiamin nélküli tápoldatban vettük fel. A kísérletek kezdetekor a kiindulási sejt koncentráció 2×10^5 -en volt. A MP kifejeződését a tenyésztés kezdetétől számított 16. órától tudtuk kimutatni (western blot analízissel), a sejtekre gyakorolt hatását a 20. órától figyelhettük meg. Kontrollként velük MP szupresszált, tiamin tartalmú kultúrákat alkalmaztunk.

4.3.5. A *S. pombe* sejtek szaporodásának vizsgálata

A MP represszált hasadó élesztő sejteket 20 μ M tiamint tartalmazó EMM mediumban, 30 oC, (200 rpm-en történő) rázatással tenyésztettük. A MP expresszió hatásait tiamint nem tartalmazó EMM tápközegben vizsgáltuk.

A sejtek szaporodásának vizsgálatához adott időpontokban mintát vettünk, a sejsűrűséget hemocytométerrel határoztuk meg. A sejtek kolóniaképző sajátságainak vizsgálataihoz egy inokulumnyi *S. pombe*-t oltottunk szelektív tiamin-tartalmú (MP szupresszált) vagy tiamint nem tartalmazó (MP indukált) EMM lemezekre. A csészéket a leírt hőmérsékleten, 3-5 nap inkubálás után értékeltük ki.

4.3.6. Sejtciklus-meghatározás

A MP hatását a sejtciklusra egy indukálható gén-expressziós rendszer segítségével vizsgáltuk in vivo. A MP hatását a sejt-fázis regulációjára több különböző módszert használtunk, mint pl. a sejtek DNS tartalmának meghatározása flow citometria segítségével, a Cdc2 molekula foszforilációs állapotának meghatározására western blot analízissel, a sejthossz-meghatározása forward scatter analízissel illetve mikroszkópos módszerrel (Masuda et al. 1996; Zhao et al. 2000). Az MP expresszázó illetve -represszázó *S. pombe* sejtek hosszának meghatározásához Leica Upright mikroszkópot, Hamamatsu kamerát, Openlab programokat használtunk. A statisztikai számítások elvégzéséhez t-tesztet használtunk (www.quickcalcs.com).

4.3.7. A Cdc2 molekula foszforiláltságának meghatározása western blot analízissel

A Cdc2 molekula foszforiláltsági állapotának vizsgálatához sejt-extraktumokat Kovelman és Russel által leírt módon készítettük el (Kovelman and Russel 1996). A sejtek fehérjetartamának kivonásához módosított RIPA puffer és Complete Mini proteáz inhibitor hozzáadásával készítettük el Mini Bead-Beater segítségével. A fehérjekoncentrációkat BCA protein kolorimetrikus esszé segítségével (Pierce) határoztuk meg. Azonos mennyiségű fehérje-kivonatot futtattunk 8-20%-os tris-HCl gradiens gélen (BioRad) tris-glicin pufferrel. A fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át, majd ezután anti-Cdc2 (Upstate), illetve anti-phospho Cdc2 (Cell Signaling) ellenanyagot használtunk a gyártók utasításának megfelelően. A futtatott fehérje-

mennyiség ellenőrzéséhez anti β -tubulin ellenanyagot használtunk. A proteinekhez kötődött ellenanyagokat SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce) és röntgen film segítségével tettük láthatóvá. Az MP indukált illetve MP supresszált kultúrák foszforilált illetve defoszforilált Cdc2 tartalmának kvantitatív analiziséhez a röntgenfilmeket scannelés után Openlab és Excel programok segítségével értékeltük ki.

4.3.8. A MP által indukált sejtciklus változások vizsgálata Flow Citometriás analízissel

A movement protein sejtciklusra gyakorolt hatásának tanulmányozásához flow citometriás kísérleteket végeztünk. A sejt kultúrák sejtciklus-profilját, illetve a sejtek DNS-mennyiségét határoztuk meg alacsony nitrogéntartalmú tápközegben (Zhao et al. 1996) történő tenyésztést követően. Az alacsony nitrogéntartalmú tápoldatokban való szaporítással a sejteket sejtciklusuk G_1 fázisában szinkronizáltuk (Alfa et al. 1993). A MP által okozott feltételezett G_2 sejt fázis stop indukcióra a G_1 szinkronizált MP represszált és MP expresszált sejtek profiljának összehasonlításával következtethettünk (Elder et al. 2000).

Az előzőektől eltérő sejtciklus-sajátságok megállapításához normál tápközegben felszaporított *S. pombe* kultúrákat vizsgáltunk FACS analízissel.

4.3.9. Konfokális és fluorescens mikroszkópos vizsgálatok

A mikroszkópos fénykép-felvételeket Leica (DMR) fluorescens mikroszkóp, Hamamatsu típusú (CCD) kamerával, OpenLab szoftver (Improvisation, Inc., Lesington, MA) segítségével készítettük. A zöld fluorescens protein (GFP) fotókhoz Leica L5 szűrőt használunk, melynek extinkciója 460-500 nm, emissziója 512-542 nm. A sejtek DNS-ének festéséhez a sejt kultúrákat 1 μ g/ml koncentrációban DAPI-val (4', 6-diamino-2-pehnylindole) kezeltük, melyet Leica A8 filterrel, extinkció 340-380 nm, emisszió 450-490 nm tettünk láthatóvá. Az *S.pombe* sejtek sejt fal- és szeptum-vizsgálatához egy citin-specifikus festéket, Calcofluort használtunk (Sigma F6259). A minták előkészítését, a DAPI- valamint Calcofluor festést Alfa et al. 1993 szerint végeztük.

5. Eredmények

A vizsgált törzseket elektroporátorral történt transzformálással állítottuk elő, amelyet a gyártó (BTX) utasításait követve végeztünk. A transzformált törzsek közül 4-et 4-et tesztelünk és a kapott tulajdonságok közül egy reprezentatívát választottunk ki.

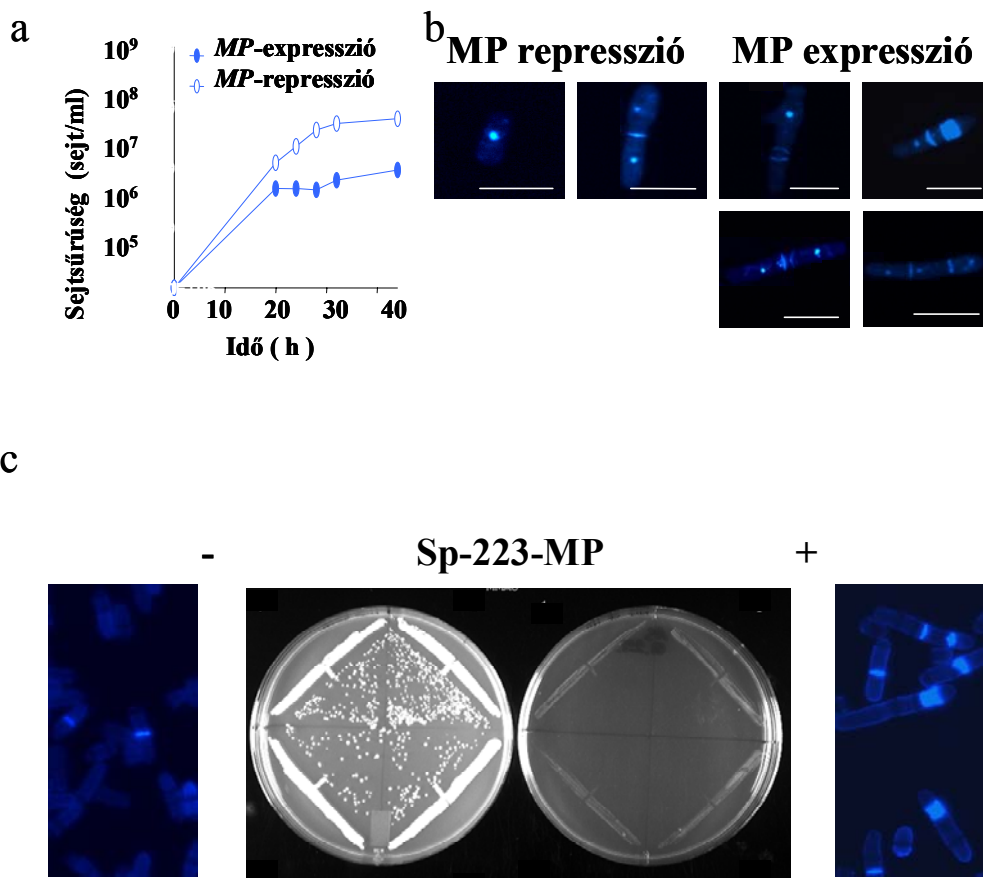
A BYDV movement proteinjét kódoló gént indukálható expressziós vektorba klónoztuk. A PYZ vektorok inszert génjének kifejeződését egy indukálható nmt1-es promóter (no message in thiamine) segítségével tudtuk be- és kikapcsolni. MP expresszázó sejtek (MP-on) és MP represszázó sejtek (MP-off) szaporodását hasonlítottuk össze. Mindkét settípust szelektív EMM tápoldatban tenyésztettük tiaminnal vagy tiamin hozzáadása nélkül. Mindkét sejt kultúrát korai log fázisú sejtekből készítettük 2×10^5 sejt/ml induló sejtszámmal. Adott időpontoként mintákat vettünk, amelyek sejtszámát meghatároztuk.

Az MP represszázó sejt kultúra körülbelül 28 órás tenyésztési idő után ért stationer fázisba, amely a *S. pombe* sejtek normális szaporodásának megfelel, mintegy 4 órás generációs idővel. Az MP expresszázó kultúra ellenben drámai szaporodásbeli visszaesést mutatott. Az MP represszázó sejtekhez képest a movement protein expresszázó kultúra több mint egy nagyságrenddel kevesebb sejtet tartalmazott mililiterenként (IV. ábra, a). Hasonló szaporodásbeli jellegzetességeket mutatott, ha a MP represszázó sejt kultúrát olyan kultúrával hasonlítottuk össze, amelyben az MP N terminális végén GFP-tagelt MP fehérjét expresszáztunk.

Movement protein expresszázó sejtek szilárd táptalaj felszínén nem képeznek telepeket (IV. ábra, c). Thiamin tartalmú táptalaj felszínén MP represszázó sejtek gyakorlatilag a vad típushoz hasonló telepképződést mutatnak.

Tehát a movement protein expresszió (tiamin mentes) tápoldatban és táptalaj felszínén egyaránt gátolja a *S. pombe* sejtek osztódását. A BYDV P4-es (ORF4) által kódolt MP a hasadó élesztő sejtekben osztódására gátló hatással van.

Megnyúlt *S. pombe* sejtek esetében igen gyakori a G₂/M setfázis-blokk és az erre jellemző szeptum nélküli megnyúlt sejt, a „cdc2 fenotípus” (Nurse et al. 1976; Lee and Nurse, 1988) (IV. ábra b, c). A BYDV MP kifejeződése által okozott sejtmelegnyúlás során szeptumokat is láthatunk, tehát a sejt fázis nem vagy nem csak a G₂ és M fázisok határán, hanem pl. M fázisban történhet.



IV ábra. A movement protein hatása *S. pombe* a sejtek szaporodására (a) tápfolyadékban, b. MP expresszált sejtek jellegzetes morfológiája DAPI és calcofluor festés (c) MP indukált és nem indukált kultúrák telepképző sajátosságai.

Tiamin-tartalmú tápoldatban (a MP gén nem expresszálódik), a movement protein génjét mint inszertet tartalmazó *S. pombe* sejtek normál hosszúságúak ($10,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$) (Zhao and Lieberman, 1995). Ezzel szemben a MP expresszált törzs esetében a sejtek átlagos hosszúsága (standard errorval) $14,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Az MP expresszált és represszált törzsek sejthossz-értékei közötti különbség szignifikáns a $p < 0,0001$ szintjén. Vad típusú sejtek esetében a maximális sejthossz $14 \mu\text{m}$, míg az MP expresszált kultúrákban a $27 \mu\text{m}$ -t is elérheti (V. ábra Aa, Ab).