

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológia Doktori Iskola  
Mikroorganizmusok életfolyamatainak molekuláris analízise

Krómvegyületek és vírusfehérjék által okozott stresszfolyamatok vizsgálata *Schizosaccharomyces pombe* sejteken

Ph.D. értekezés tézisei

**Antal Judit**

Témavezető:

**Prof. Pesti Miklós**

Tanszékvezető egyetemi tanár

**PÉCS, 2010**

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológia Doktori Iskola  
Mikroorganizmusok életfolyamatainak molekuláris analízise

Krómvegyületek és vírusfehérjék által okozott stresszfolyamatok vizsgálata *Schizosaccharomyces pombe* sejteken

Ph.D. értekezés tézisei

**Antal Judit**

Témavezető:

**Prof. Pesti Miklós**

Tanszékvezető egyetemi tanár

**PÉCS, 2010**

## BEVEZETÉS

A homeosztázist, vagyis azt a dinamikus egyensúlyt, amelynek segítségével az élőlények állandó önfenntartó működésüket biztosítják, folyamatosan azt veszélyeztető hatások teszik próbára. Nem csupán a külvilágban, hanem még az intracelluláris térben is, például a légzési folyamatok eredményeként, illetve bizonyos enzimek működésének velejárójaként káros melléktermékek, így többek között reaktív oxigéngyökök (ROS) károsíthatják a sejteket.

Az élő szervezetek számára bizonyos elemek, így egyes fémek vegyületei is létfontosságúak lehetnek. Egészséges környezetben a fémek, mint enzimmakotók nanomólos koncentrációban vannak jelen az élőlényekben. Az iparban széles körben alkalmaznak olyan vegyületeket, amelyekben a króm legtöbbször egy instabil, +6-os számú oxidációs állapotban van jelen. A króm gyors redukciója során reaktív intermedierek képződnek, amelyek a sejtekben többféle károsító reakciót indíthatnak el, amelynek része a DNS javító enzimeinek gátlása, vagy a szignál transzdukciós útvonalak aktiválása. Az erőteljes külső stresszhatások akár a sejtek örökítőanyagának károsodásához és így például malignus transzformációhoz vezethetnek. Ismertek azonban olyan mikroorganizmusok is, amelyek a nehézfémekkel illetve azok káros hatásaival szemben rezisztenciát mutatnak (Nies 1999).

A különböző eredetű stresszfolyamatok élő szervezetek genetikai hátterére gyakorolt hatása – egyelőre – nagyrészt tisztázatlan. A stresszhatásokkal szemben mutatott toleranciáért illetve érzékenységért felelős tulajdonságok vizsgálatának egyik lényeges lépése lehet például megfelelő mutáns törzsek létrehozása és vizsgálata. A mutáns gének illetve géntermékek vizsgálatával többet tudhatunk meg arról, hogyan és milyen génekre hatnak az egyes oxidatív stresszorok, nehézfémek, így például a króm is az élő sejtekben (Halliwell és Gutteridge, 1999).

Az élő szervezetekre nézve stresszhatást jelenthetnek az őket megtámadó vírusok által kódolt fehérjék, amelyek szerepe a virális fertőzés eredményességében meghatározó tényező. Az AIDS („acquired immune deficiency syndrome”) tünetegyüttesét okozó vírusok között a HIV-1-es típusú („human immunodeficiency virus type 1”) is több olyan „accessory protein”-nel azaz járulékos fehérjével rendelkezik, amelyeknek szerepet tulajdonítanak a vírusfertőzésben. Ez a vírus az előbb említettek között rendelkezik egy 15 kDa nagyságú, virionhoz kötött fehérjével, a Vpr-el („viral protein type R”) (Elder és mtsi., 2002).

A Vpr protein bizonyítottan felelős a HIV vírus fertőzőképességéért, jelenléte segíti a vírus replikációs ciklusát, és számos sejtalkotóra hatva, eddig nem teljesen ismert módon patogenezist idézhet elő. A Vpr egyes irodalmi utalások szerint önmagában is képes oxidatív stresszt okozni; a Vpr és oxidatív stressz kapcsolatáról, sem a Vpr-expresszálo *S. pombe* tenyészetek oxidatív stressz-vizsgálatáról nem álltak rendelkezésünkre adatok. A HIV vírusfertőzés egyes fázisaira jellemző az oxidatív stressz megléte, amely ellen a betegség kezelése során antioxidáns tartalmú szereket, ún. koktélt adnak az AIDS betegeknek (Dunable 1998). Ez esetben lényeges kérdés lehet az, hogy vajon az intracelluláris stresszt okozó, a sejtekben expresszált Vpr fehérje és az emellett ható, külsőleg adott oxidatív stressz élő szervezetet károsító hatása valóban összeadódik-e?

Egy másik, az árpa sárgulását és törpeségét okozó, BYD vírus MP („movement protein”)-jének hatásáról, a vírusfertőzés során betöltött szerepéről korábban egyáltalán nem szolgált adatokkal a szakirodalom. A BYDV a megtámadott növények törpe növényt, sárgulását és haszonnövények esetében a termés jelentős csökkenését okozza. Kizárólag az MP fehérje által kiváltott hatások részletes vizsgálata adhat választ arra, hogy mennyiben járul hozzá a MP a BYD vírus által megfertőzött növények lelassult fejlődéséhez. Amennyiben az MP legjellemzőbb funkciói érintik a sejtosztódás normális lefolyását, illetve annak gátlását, az magyarázatot adhat a törpe növényekre. Az esetlegesen érintett célmolekulák vizsgálatához a genetikai analízis nyújthat lehetőséget. Azonban növényi sejt kultúrákon megfigyelni ezen funkciókat igen költséges és nehézkes technológiai megoldásokat igényel. A MP hatásának *in vivo* vizsgálatára jó alternatívát biztosít a hasadó élesztő, *S. pombe* sejtekben expresszálván vizsgálható az MP példának okáért genetikai analízis során, mivel ezen a modellorganizmuson végzett kísérletek eredményeit nagy biztonsággal lehet alkalmazni más eukarióta szervezetekre, így növényekre is.

## CÉLKITŰZÉSEK

A különböző eredetű oxidatív stresszfolyamatok hátterének vizsgálatával az alábbi célkitűzéseink voltak:

1. A krómérzékenységért illetve krómtoleranciáért felelős gének vizsgálatához tetrád-analízisek során egy génben mutáns: króm toleráns vagy króm szenzitív, stabil genetikai háttérrel valamint *leu1-32* és *ura4-D18* markerekkel rendelkező *S. pombe* törzsek előállítása.
2. Megvizsgálni a Vpr fehérje és oxidatív stressz együttes hatását hasadó élesztő modellen.
3. A MP fehérje által indukált sejtciklus megállás bizonyítása *S. pombe* modell használatával.
4. Bebizonyítani, hogy a MP expressziója a mitózis lefolyásáért felelős Cdc2 kináz molekula hiperfoszforilációját okozza hasadó élesztőben.
5. Új ismeretek szerzése a MP protein lehetséges célmolekuláiról, az eukarióta sejtek szaporodásának megállításáról, amely a MP hatására következik be.
6. Kimutatni, hogy a MP egy lehetséges BYDV virális determináns, és hasadó élesztő-rendszer segítségével megválaszolni azt, mely legfontosabb sejtfunciókat érinti és így felelős lehet-e a vírus fertőzőképességéért, illetve a növények növekedésének visszamaradásáért.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A *S. pombe* króm-toleráns (*chr1-14 T*, *chr-09 T*) és króm szenzitív (*chr-23S*, *chr-33S*) törzseinek tetrádanalízisét végeztük el. A spórázóképeséget Bürker-kamra segítségével vizsgáltuk.

A keresztezések során kapott spóráklónok tesztelése króm-toleranciára és auxotrófiára szelektív táptalajok segítségével történt.

A Vpr fehérje eukarióta sejtekre kifejtett hatásának vizsgálatához *in vivo* módszereket, vagyis speciális *S. pombe* törzseket használtunk.

A Vpr gén be- és kikapcsolásához egy nmt1-es promotert alkalmaztunk. A táptalaj illetve tápoldat tiamin-tartalma biztosította a teljes génrepressziót, a tiamin hozzáadása nélkül készült táptalajokban illetve tápoldatokban a vad típusú Vpr-t kódoló gén expresszáldott. Sejtmorfológia és osztódóképesség vizsgálata hemocytométerrel, illetve mikroszkóp és kamera segítségével történt.

*S. pombe* törzsek adaptív és akut oxidatív stressz-vizsgálatát H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalmú tápoldatok felhasználásával végeztem.

DNS mennyiség és sejtciklus vizsgálatok flowcytometriás méréseihez a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szenzitivitási tesztet alacsony nitrogén-tartalmú tápfolyadékban végeztük el. A mintákat etanollal fixáltuk. RNase-kezelés és propidium-jodidos festés után méréseket végeztünk a sejtek DNS-tartalmának meghatározására, illetve a sejthossz vizsgálatára.

A BYDV MP hatásának tanulmányozásához *S. pombe* sejtek főbb funkcióit érintő, genetikai analízisen alapuló modellrendszerrel dolgoztunk. A BYDV MP-t kódoló génszakaszt nmt1-es promóter által indukálható expressziós vektorokba klónoztuk. A vektorokat *E. coli*-ba transzformáltuk, majd a plazmid DNS-t kivonva restriktációs emésztéssel valamint PCR reakcióval ellenőriztük. A klónozott MP pontos szekvenciáját automata szekvenáló berendezés segítségével határoztuk meg és hasonlítottuk össze az eredetivel.

Az ellenőrzött vektorok *S. pombe* sejtekbe transzformálásához Electro Cell Manipulator-t használtunk. A törzsek sejtmorfológiáját, osztódási sajátosságait, a fehérje lokalizációját, a gén-kifejeződés jellegét teszteltem.

*S. pombe* törzsek MP gén-indukciójának vizsgálatához tiamin-mentes kultúrákat használtunk. Kontrollként MP szupresszált, tiamin tartalmú kultúrákat, valamint üres plazmidot tartalmazó sejteket alkalmaztunk. A sejtek morfológiai vizsgálatához konfokális és fluorescens mikroszkópos fénykép-felvételeket megfelelő kamera segítségével készítettük. A sejthossz meghatározása forward scatter analízissel illetve mikroszkópos módszerrel történt. A statisztikai számítások elvégzéséhez Student-féle t-tesztet ( $p < 0,0001$  szignifikancia-szinten) használtunk.

A MP fehérje lokációját a fehérje N-terminális végéhez kötött GFP segítségével követhettük nyomon a sejtekben. A sejtmag DNS-ének festéséhez a sejt kultúrákat DAPI-val kezeltük. Az *S. pombe* sejtek sejtfal- és szeptum-vizsgálatához calcofluort használtunk.

A *S. pombe* sejtek szaporodásának vizsgálatát tiamint tartalmazó folyékony tápközegben végeztük. A sejtsűrűséget Bürker-kamrával határoztuk meg. A sejtek kolóniaképző sajátosságainak vizsgálatához az *S. pombe* törzseket oltottuk tiamin-tartalmú illetve tiamint nem tartalmazó EMM táptalajokra.

A MP sejtciklusra gyakorolt hatásának tanulmányozásához flowcytometriás kísérleteket végeztünk. A sejt kultúrák sejtciklus-profilját, illetve a sejtek DNS-mennyiségét határoztuk meg. A kultúrákat sejtciklusuk G<sub>1</sub> fázisában szinkronizáltuk. A MP által okozott, sejtciklusra gyakorolt változásokra az MP-represszált és MP-expresszált sejtek profiljának összehasonlításával következtethetünk.

A Cdc2 molekula foszforilációs állapotának meghatározására western blot analízist végeztünk. A fehérjekoncentrációkat kolorimetrikus esszé segítségével határoztuk meg. A futtatott fehérje-mennyiség ellenőrzéséhez anti  $\beta$ -tubulin ellenanyagot használtunk. A proteinekhez kötődött ellenanyagokat röntgen film segítségével tettük láthatóvá. A foszforilált illetve defoszforilált Cdc2 tartalmának kvantitatív analíziséhez a röntgenfilmeket scannelés után a megfelelő analízáló programok segítségével értékeltük ki.

## EREDMÉNYEK

Megváltozott krómérzékenységű *S. pombe* mutánsok előállítása

A krómérzékenységért illetve krómtoleranciáért felelős gének vizsgálatához egy génben mutáns, króm toleráns vagy króm szenzitív, stabil genetikai háttérrel valamint megfelelő markerekkel rendelkező törzseket állítottam elő tetrádanalízisek során.

Keresztezések *ura4-D18* marker bevitelére:

A *9chr<sup>+</sup>* (*leu1-32 h<sup>+</sup>*) szülői törzsből származó Cr(VI) toleráns (T) és szenzitív (S) mutánsokat a *chr2-04T*-t, a *chr-09T*-t, a *chr1-14T*-t, a *chr-23S*-t és a *chr-33S*-t kereszteztük a *89chr<sup>+</sup>* (*ura4-D18 h<sup>+</sup>*) törzssel, egyrészt azért, hogy kiválasszuk a mutánsok közül az egy génben sérülteket, másrészt azért, hogy ezen törzsek közül kiemeljük azon rekombinánsokat, amelyek megtartották a Cr(VI) szenzitivitásukat illetve toleranciájukat ugyanakkor hordozzák a transzformációhoz szükséges uracil auxotrófiát, az *ura4-D18* markert.

I. keresztezés: (*chr2-04T x 89chr<sup>+</sup>*):

A tetrádanalízisek eredménye egy génben bekövetkezett mutációt valószínűsített, hiszen a 25 teljes tetrádban a hasadási arány 2T:2S volt. Négy krómtoleráns (MGKCr(VI): 275  $\mu$ M) rekombinánsot kaptunk *leu1-32* vagy *ura4-D18* markerekkel. Ezek közül a *chr2-046T* jelűt emeltük ki későbbi transzformációs kísérletekhez. Random spóra analízis végeztünk a *chr2-04T* és a *chr1-66T* törzsek között és a vizsgált 104 spóra közül csupán 44 bizonyult Cr(VI) toleránsnak (MGKCr(VI): 275  $\mu$ M). Ezen eredmények azt mutatták, hogy a Cr(VI) toleranciáért felelős mutációk nem allélikusak ezen mutánsokban, azaz két különböző génben történtek (Czakó és mtsi, 2004). A *chr2-046T* törzset transzformációs kísérletekhez azért nem használtuk, mert az időközben kidolgozott direkt szelekciós módszer, amely a transzformánsok kiválasztására használható (Koósz és mtsi, 2008) genotípus függő és a *chr1-663T* mutánsnál ez használható volt, míg a *chr2-046T*-nél nem.

II. keresztezés: (*chr1-14T x 89chr<sup>+</sup>*):

A kapott 29 tetrádból 28 volt teljes, azaz ezeknek minden spórája csíráképesnek bizonyult (Czakó és mtsi., 2004). A hasadási arány a krómtesztben 95 % +/- 5 % adott 2T:2S szegregációt. A +/- 5 % abból adódhatott, hogy a króm tesztben a sejtszámot pontosan be tudtuk állítani, azonban a krómmal szembeni érzékenységet befolyásoló sejtfázis változhatott. A 8 keresztezésben 400 spóra került kihúzásra, melyből 266 volt életképes, tehát ez 66,5 % életképességi arányt jelent. A spóráklónok közül 18 uracil auxotróf króm toleráns rekombinánsot szelektáltunk.

Ezen 18 Cr(VI) toleráns rekombinánsok közül az egyikkel random spóra analízist végeztünk, azaz kereszteztük a *chr1-66T* törzssel, melynek eredményeként kapott 84 spóráklónból 73 Cr(VI) toleranciát mutatott. Ez azt valószínűsítette, hogy a két keresztezett mutánsban a mutáció ugyanabban a génben történt.

A további kísérletekhez azokat a spóráklónokat választottuk ki, amelyek króm-toleráns jelleget mutatnak és uracil- illetve leucin- vagy uracil- leucin- kettős auxotrófiát hordoznak. Ezek a spóráklónok a *89chr<sup>+</sup>* -es és *chr1-14 T* -es törzsek keresztezéséből származó: *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*. Mivel a tetrád-analíziseket egy génben mutáns: króm toleráns vagy króm szenzitív, stabil genetikai háttérrel rendelkező törzsek előállítására céljából végeztem, ezért a további munkához a *89chr<sup>+</sup>* -es és *chr1-14 T* -es törzsek keresztezéséből származó 2-2 kiválasztott spóráklón: a *92/7b*, *92/7d*, valamint a *97/14c*, *97/14d* lett.

III. keresztezés: (*chr23S x 89chr<sup>+</sup>*):

IV. keresztezés: (*chr33S x 89chr<sup>+</sup>*):

A fenti két keresztezés során nem kaptunk aszkuszokat, így a tetrádanalízist nem tudtuk elvégezni.

V. keresztezés: (*chr1-09T x 89chr<sup>+</sup>*):

Négy alkalommal történt keresztezések során 56 teljes tetrád kihúzásra történt meg, ebből 176 db spóráklón volt életképes, ami 78,57 %-os életképességi arányt jelent. A 31 teljes tetrádból 2:2-es szegregációt 6 esetben kaptunk.

Az auxotrófia tesztekben 2:2-es hasadást mutató teljes tetrádok króm tolerancia tesztjeinek eredményei alapján gyakorlatilag nem találtunk olyan utódokat, amelyek a tervezett kísérletekhez szükséges kritériumoknak megfeleltek volna. Az ezen keresztezés során izolált törzsek nagy része később az általános tenyésztési paraméterek között nem maradt életképes. Ezért a további munkához a *89chr<sup>+</sup>*-es és a *chr-09T* jelű szülők utódait nem használtuk fel.

VI. keresztezés: (*chr1-662T x 21chr<sup>+</sup>*) (Második keresztezés a (*chr1-662T* transzformálhatóságáért):

A *6chr<sup>+</sup>* (*lys1-131 h<sup>-</sup>*,  $MGK_{cr(vi)}$ : 250  $\mu$ M) szülői törzsből mutagenézissel készült a *chr1-66T* (*lys1-131 h<sup>-</sup>*,  $MGK_{cr(vi)}$ : 275  $\mu$ M) mutánst, amelynél a mutáció a tetrádanalízis alapján egy génesnek bizonyult keresztezve a *90chr<sup>+</sup>* (*ura4-D18 h<sup>+</sup>*,  $MGK_{cr(vi)}$ : 250  $\mu$ M) törzssel. Ebből a keresztezésből származó spóráklónok a *chr1-661T* valamint a *chr1-662T* mindkettőnél (*662Tlys1-131 ura4-D18 h<sup>-</sup>*,  $MGK_{cr(vi)}$ : 275  $\mu$ M). Mivel a *chr1-662T* nem volt transzformálható a pUR18N vektorral, ezért „tisztítani” kellett, amelyhez a *21chr<sup>+</sup>* használtuk keresztezési partnernek (Czakó és msti., 2004, Koósz és msti., 2008).

A munka során összesen 100 db spóra került kihúzásra, amelyből 88 db volt életképes, 88%-os arányban. Összesen 15 db teljes tetrádot kaptam, amelyek spóráklónjai közül a kívánt auxotrófiát és krómtoleráns tulajdonságokat együtt, 2:2-es hasadási arányban a *12/9c* és *12/9a* (későbbi publikációs kódja: *chr1-663T lys1-131 ura4-D18 h<sup>-</sup>*) hordozták.

Hogy valóban stabil genetikai háttérrel valamint megfelelő markerekkel rendelkező egy génben mutáns törzseket kapjunk, ezért a kapott spóráklónok további „tisztítása”, visszakeresztezése vált szükségessé. A spóráklónok közül a *12/9a* jelűt kereszteztem újra a vad típusú szülői törzssel.

VI./a keresztezés: (*12/9a x 21chr<sup>+</sup>*):

180 db kihúzott spórából 165 db szaporodott tovább, az így kapott 91,66 %-os életképességi arány magasabb volt, mint az V. számú keresztezésben ezt a „tisztítási folyamat” során vártuk is. A 32 db teljes tetrádból az auxotrófia tesztek során 29 db-nál hasadtak 2:2-es arányban a szülői tulajdonságok. Ezek további krómtolerancia tesztjei során a kívánt krómtoleráns és megfelelő, uracil auxotrófiával 5 teljes tetrád 2-2 spóráklónja rendelkezett. Ezek a *21/6c*, *21/6d*, *21/11a*, *21/11c*, *21/24b*, *21/24c*, *21/25a*, *21/25d*, *21/31b*, *21/31c*.

A kísérletek során a *chr1-662T* mutáns keresztezésével kapott *chr1-663T* króm toleráns transzformálható szegregánst egy a GR-t kódoló, *pgr1+* gént tartalmazó expressziós vektorral transzformálták. A transzformánsok vizsgálatok mértek krómérzékenység valamint GR aktivitás a GR-NADPH rendszer fontosságára mutat rá a krómtoleráns tulajdonságok létrejöttében (Koósz és msti., 2008).

VII. keresztezés: (*chr1-046T x 21chr<sup>+</sup>*)

A keresztezések során 172 db spóra kihúzása történt meg, ebből 169 db volt életképes, ez 98,25 %-os életképességi arányt jelent, összesen 40 db teljes tetrádot kaptam. A kapott 40 db teljes tetrádból az auxotrófia tesztek során összesen 11 db 2:2-es hasadást kaptunk, amelyek részben *2leu<sup>-</sup>:2ura<sup>+</sup> leu<sup>-</sup>* illetve *2p<sup>+</sup>:2ura<sup>+</sup> leu<sup>-</sup>*. Mivel kettős auxotrófiával rendelkező króm toleráns spóráklónokat kerestünk, ezért csak azt a 8 db teljes tetrádot vizsgáltuk tovább krómtoleranciára, amelyekben prototróf és kettős auxotrófiával bíró spóráklónokat találtunk.

A későbbi krómtolerancia tesztek alapján csupán a *31/15a* valamint a *31/15b* spóráklónok bizonyultak egyszerre krómtoleránsnak és leucin-uracil kettős auxotrófiájúnak.

Mivel a 40 teljes tetrádból mindössze csak egy mutatta az általunk keresett tulajdonságok 2:2-es hasadását, ezért feltételezhetően a kapott spóráklónjaink még mindig egynél több génben sérültek. Egy génes mutánsok létrehozásához további kísérletek során a *31/15a* jelű mutánst tovább kereszteztem.

VII./a keresztezés: (*31/15a x 21chr<sup>+</sup>*)

A keresztezés során 196 db spórát húztam ki, ebből 174 db volt életképes, amely 88,77%-os életképességnek felel meg. A továbbiakban transzformálásra alkalmas spóráklónok csak 2 db-ot a *41/9c* valamint a *41/9d* jelűt sikerült izolálnom. Rádásul ezek a mutánsok bár az általunk keresett auxotrófia markerekkel rendelkeztek és krómtoleránsok voltak, a krómra mutatott MGK értékük hozzávetőleg 25  $\mu$ M-al alacsonyabb volt a mutáns szülői törzsnél. Mivel azonban az

életképességi arányok és a klónok kezelhetősége is csökkent, holott keresztezésről keresztezésre ezeknek javulniuk kellett volna ezért az feltételeztük, hogy a kívánt tulajdonságok mellett még több más mutáció is található a genomban, ezért ezeket a mutánsokat a további munkánk során nem használtuk.

A fenti keresztezésekből kaptuk a *chr1-663T (lys1-131 ura4-D18 h*, MGK<sub>cr(VI)</sub> 250  $\mu$ M) törzset, amelyet a későbbi transzformációs kísérletekben eredményesen használtunk (Koósz és mtsi., 2008).

#### A Vpr fehérje és oxidatív stressz együttes hatásának vizsgálata

Különböző koncentrációjú hidrogén-peroxid stressz sejt-morfológiára valamint szaporodási intenzitásra gyakorolt hatását vizsgáltam Vpr-expresszálló *S. pombe* sejt kultúrákban.

Kimutattuk, hogy a korábbi irodalmi adatokkal egyezően *S. pombe* sejtekben indukált VprNL4-3 protein hatására megnyúlt, nem osztódó sejtek (*cdc2* fenotípus) jelennek meg és sejtpusztulás tapasztalható.

Kimutattuk azt, hogy az 1  $\mu$ M tiamin hatására a Vpr expresszálló sejtek gyorsabban osztódtak, mint a kezeletlenek ám ugyanez a kezelés nem okozott változást a sejt morfológiájában.

Kísérleteink során úgy találtuk, hogy a 0.15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és 1  $\mu$ M tiamin együttes adásával a hatására a Vpr represszálló sejtek között nem változott az elongált sejtek aránya, míg a Vpr-t termelő sejtek életképességét ugye az a kezelés 18 %-al csökkentette a 0.15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléshez képest.

1 sejtciklus hosszúságú 0.15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására a sejtek 15 % megnyúlt a Vpr represszálló kultúrákban, amelyet flowcytometriás módszerekkel is kimutattunk.

Adaptív és akut stressz hatására ez a megnyúlt sejt populáció eltűnt, és a sejtek nagy többségének csökkent a sejt mérete a kontrollhoz képest, míg a Vpr-expresszálló sejtek esetében a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására nem történt látványos sejt méret-változás.

Megfigyeléseink azt támasztják alá, hogy ugyan a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> egyes koncentrációi időlegesen képesek kompenzálni a Vpr-expresszió *S. pombe* sejtekre kifejtett káros hatását, a kezelése során sejt ciklus-jellemzők nem változnak meg és permanensen nem szüntetik meg a sejt osztódás Vpr által indukált megállását G<sub>2</sub> sejt fázisban.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a Vpr-represszálló sejtek esetében 2 óra alatt az adaptív stressz közel 20 %-al csökkenti a sejtek túlélését, míg az akut stressz a sejtek körülbelül 80 %-át pusztítja el. Vpr expresszálló sejtek esetében az adaptív stressz válasz 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 ugyanennyi idő alatt.

#### A MP fehérje által indukált sejt ciklus-változások vizsgálata

A MP által indukált mechanizmusok vizsgálatához a törzseket elektroporátorral történt transzformálással állítottam elő, majd teszteltem őket. Kimutattam, hogy az MP-expresszió tápoldatban és táptalaj felszínén egyaránt lelassítja a *S. pombe* sejtek szaporodását. A BYDV P4-es ORF4 által kódolt MP a hasadó élesztő sejtek osztódását gátolta.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a vad *S. pombe* sejtek 10,4  $\pm$  0,2  $\mu$ m hosszúságúak, ezzel szemben a MP-expresszálló törzs esetében a sejtek átlagos hosszúsága 14,8  $\pm$  0,4  $\mu$ m. Kimutattuk, hogy vad típusú sejtek esetében a maximális sejthossz 14  $\mu$ m, míg az MP expresszálló kultúrákban a 27  $\mu$ m-t is elérheti.

Eredményeink alapján a MP represszálló logaritmikus fázisú sejt kultúrákban a szeptált sejtek aránya 8 és 15 % között változott, míg ugyanezen érték az MP-expresszálló sejtek esetében a 34 % volt maximálisan. A BYDV MP kifejeződése által okozott sejt megnyúlás során detektált szeptált sejtek arra utalnak, hogy a sejt fázis blokk nem, vagy nem csak a G<sub>2</sub> és M fázisok határán, hanem pl. M fázisban történhet.

Eredményeink azt mutatják, hogy a sejt ciklus-mutánsok (*rad 3*, *check 1*, *cds 1*, *check1 cds 1*) mutánsok genetikai háttere nem okoz változást a MP hatásában, ezért elmondhatjuk, hogy ezen mutáns gének egyikére sincs hatással a MP.

Megvizsgáltuk a PP2A enzim mutánsait, amelyek közül egyedül a *Apab1* mutáció volt képes részben szuppresszálni a MP hatását. Ezek a sejtek morfológiai változást nem, csupán szaporodásbeli csökkenést mutattak MP expresszió hatására.

A *Appe1* („pp2A like enzyme”) mutáns teljes szuppressziót mutatott a MP hatásával szemben: a sejtek normál fenotípust, sejthossz, szaporodási jellemzőket és telepképző sajátságokat mutattak. Ez arra enged következtetni, hogy a „pp2A like enzyme” a MP egyik lehetséges célmolekulája, míg a PP2A csupán részben érintett. Ez a két enzim bizonyos, átfedő funkciói miatt lehetséges.

Kimutattuk, hogy a Cdc2 molekula két különböző pontmutációját hordozó törzsek közül a Wee1 foszforilációra érzékenyebb *cdc2 1w* mutáns teljes szuppressziót mutatott a MP-re, míg a *cdc2 3w* mutánsra ez nem volt igaz.

Western blot analízist végeztünk a MP expresszió Cdc2 molekulát foszforiláló hatásának kimutatására, amely a sejt osztódás megállításának igazolását adta eredményként.

Több kísérleti eredmény is azt sugallja, hogy a Wee1 is egyike lehet a MP célmolekuláinak. Azt az eredményt kaptuk, hogy MP hatására nem változik ezen törzs szeptálttsága, ami arra enged következtetni, hogy a Cdc25 fehérje is érintett valamilyen módon a MP hatásában.

GFP-fúzionált MP fehérje segítségével kimutatott kísérletekkel igazoltuk, hogy a MP mindig a sejtmaghoz kötődve helyezkedik el azokban a mutánsokban, amelyek nem képesek szupresszálni a MP hatását. Kizárólag a MP minden funkcióját kivédeni képes *Appe1* mutáns nem mutat GFP-MP aggregációt a sejtmag közelében, ami egyfajta morfológiai igazolását adta az adott törzs teljes MP-szupressziójának.

## ÖSSZEFOGLALÁS

1. Egy keresztezési programban, több száz elvégzett tetrádanalízis segítségével olyan krómtoleráns mutáns törzseket (spóráklónokat) állítottam elő, amelyek biztosan egy génben sérültek, stabil genetikai háttérrel rendelkeztek és ezekben a törzsekbe még markerként szolgáló auxotróf mutációt (*ura4-D18*) is bevittem. A későbbiekben a keresztezésekből kapott krómtoleráns (MGK 250  $\mu$ M) *chr1-663T* mutánt további eredményes kísérletekben vett részt, melyek során a pUR18N (*pgr1+*) vektorral transzformálták. A transzformált törzsekkel végzett kísérletek alapján elmondható, hogy az általuk mutatott krómérzékenység valamint GR aktivitás alapján a GR-NADPH rendszer jelentős szerepet játszik a krómtolerancia létrejöttében (Koósz és mtsi., 2008).

2. Az irodalom által korábban feltételezett oxidatív stresszorként említett HIV-1 Vpr proteinjének valamint az oxidatív stressz kapcsolatát vizsgálva a kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a Vpr fehérje és az ezen felül külsőleg adott oxidatív stressz sejtkárosító hatása nem adódik össze, hanem valójában ennek éppen ellenkezője történik. Vagyis a Vpr expresszálnó *S. pombe* kultúrák  $H_2O_2$  kezelése az alkalmazott koncentrációtól függően valójában adott időtartamban megnövelte a sejtek túlélését. Az előkezelés nélküli, akut (25 mM  $H_2O_2$ ) által okozott oxidatív stressz és a Vpr együttes hatására rövid távon, körülbelül egy sejtciklusnyi idő alatt 80.3 %-al nőtt az életképes sejtek aránya a kezeletlen Vpr termelő kultúrákkal összehasonlítva. Az adaptív (1 órás 0.15 mM  $H_2O_2$  előkezelés után alkalmazott 25 mM  $H_2O_2$  végkoncentrációjú) stresszhatás 15.8 %-al növelte meg a Vpr expresszálnó sejtek túlélését. Tapasztalataink szerint tehát a  $H_2O_2$  megfelelő dózisa által indukált védekező mechanizmusok időlegesen képesek felfüggeszteni a Vpr sejtölő hatását. Emellett arra is következtethetünk, hogy a Vpr és a  $H_2O_2$  által okozott stressz részben közös útvonalakat érintve működik.

3. Kísérleteinket megelőzően a BYDV MP-t részletesen még nem vizsgálták, ezért *S. pombe* mutánsokon tanulmányoztam a MP sejtosztódásra kifejtett hatását. Vad típusú *S. pombe* törzsben (*SP223*) és néhány sejtciklus-mutánsban (*rad 3-139*, *chk 1*, *cds 1*, *chk1cds 1*, *ppa2*) expresszálnó a MP-t a kultúrákat megnyúlt, többszörösen szektált, egyenlőtlen kromoszóma-eloszlású sejtek jellemezték. Azonban a későbbiekben azon szupresszor mutációkat kerestem, amelyekben a MP expresszió nem okoz változást sem a *S. pombe* morfológiájában sem sejtosztódásbeli sajátágaiban.

4. Western blot analízissel kimutattam, hogy MP expresszió hatására a *S. pombe* sejtekben az osztódás egyik kulcsmolekulája a Cdc2 nagyrészt foszforilált állapotban van, ezek a sejtek az osztódásban megálltak. A *cdc2 1w* mutáns a MP expressziója ellenére az eredeti törzsével megegyező tulajdonságokat mutatott. A *cdc2 1w* mutáns egy olyan pontmutációt hordoz, amely a Cdc2 molekula foszforilációját nagymértékben gátolja, ez az eredmény szintén a MP hatására erősen foszforilálódó Cdc2 fehérjére utal.

5. Kutatásaim során olyan törzseket találtam (*cdc2-1w*, *Appe1*, *wee1-50Δmik1*) amelyek a sejt kultúráiban termelődő MP fehérje hatása mellett is az eredeti mutánsal megegyező tulajdonságokkal rendelkeznek. Az egy adott törzsre jellemző mutáció egy bizonyos fehérje funkcióvesztésével járt, emiatt bizonyos esetekben ezekre az MP nem tudott hatást kifejteni. Ezek a fehérjék azok, amelyek a MP hatás útvonalának lehetséges elemeire engednek következtetni mint például a Cdc25, Cdc2, Wee1 amelyek a sejtciklus megállásért felelős enzimek közé tartoznak. Hasonlóképpen a „pp2A like enzyme” azaz Ppe1 amely például a sejtosztódás során a kromoszómák eloszlásáért is felel az utódsejtekben.

6. *S. pombe* sejtekben a MP expresszálnó a kultúrákban többszörösen szektált sejteket, egyenlőtlen eloszlású kromoszómákat, vagyis mitotikus abnormalitásokat tapasztalunk. Ezek a sejtek további osztódásra nem képesek. Az MP expresszió tehát önmagában is előidézi a BYDV fő károsító hatásait. Tehát kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a BYDV által kódolt MP vírusdetermináns, amely önmagában is felelőssé tehető a fertőzött növények fejlődésének visszamaradásáért és így a vírus által okozott mezőgazdasági károkkért.

## ÚJ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA

1. A *S. pombe* krómtoleráns és króm szenzitív tulajdonságainak közelebbi vizsgálataihoz krómtoleráns mutáns hasadó élesztő törzseket állítottunk elő, amelyek egy génes mutációt hordoznak, genetikai hátterük stabil valamint a további kutatásokhoz megfelelő auxotróf markerekkel rendelkeztek. Ezek a *chr2-04T* és a *chr1-663T* elnevezésű mutánsok.



2. A Vpr-expresszálo *S. pombe* sejtek alacsony koncentrációjú oxidatív stresszrel (0.15 mM H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> -dal) történő kezelése során azt tapasztaltuk, hogy a Vpr-expresszióra jellemző megnyúlt sejtek aránya 98 %-ról 43 %-ra csökkent. Ugyanezen sejt kultúrák esetében a sejtek életképessége megnőtt a kezelést követő első sejt ciklus alatt. Továbbá a 0.15 mM H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> kezelés hatására a második sejt ciklustól jellemző a Vpr fehérjét termelő *S. pombe* sejtek túlélésének megnövekedése.
3. Kimutattuk, hogy a Vpr expresszálo sejtek az akut, 25 mM H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> által okozott oxidatív stressz megnövekedett túlélését okozta rövid távon, körülbelül egy sejt ciklusnyi idő alatt.
4. Kísérleteink során azt találtuk, hogy az adaptív H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> kezelés szintén megnövelte a túlélés arányát, ám az előkezelés nélküli, akut H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> stressz jóval hatékonyabbnak bizonyult a Vpr-expresszálo *S. pombe* sejtek túlélésének javítására. H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> stressz ellen védő mechanizmusok nem szüntették meg a G<sup>2</sup> sejt fázis blokkot, hanem az alatt fejtették ki hatásukat. Ezen megfigyelések azt támasztják alá, hogy a Vpr fehérje és a H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> által indukált stressz részben közös hatásmechanizmussal/útvonalon halad, illetve hogy a H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> megfelelő dózisa által indukált védekező mechanizmusok időlegesen képesek felfüggeszteni a Vpr sejtölő hatását.
5. Előállítottuk azt a 39 *S. pombe* alaptörzset, amelyek segítségével a BYDV MP hatását vizsgáltuk.
6. Kimutattuk, hogy az MP hatására a sejtek megnyúlnak, és osztódásuk megáll. A movement protein olyan mitotikus abnormalitásokat okoz, mint például a többszörös szeptálság, a kromoszómák egyenlőtlen eloszlása, az utódsejtek aneuploidiaja. Eredményeink arra utalnak, hogy a MP nem csupán a sejt ciklus lefolyására, hanem a sejt osztódás során a kromoszómák egyenlő eloszlására is negatívan hat. Tehát kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a BYDV által kódolt MP virusdetermináns hasadó élesztőben történt expressziójával a virusfertőzés egészére jellemző főbb deformítások jelentek meg.
7. A MP célfehérjéi közül elsőként azonosítottunk olyanokat, amelyek a klasszikus G<sup>2</sup>/M stoppért felelős enzimek, mint például a Cdc2, a Cdc25 és a Wee1. Tehát a MP egy részben ismeretlen útvonalon keresztül hat a sejtekben, amelynek egyes elemei megegyeznek a sejt osztódás G<sup>2</sup>/M fázisban történő megállításáért felelős fehérjékkel.
8. A PP2A-like enzimet, amely felelős lehet a sejt osztódás normális lefolyásáért úgyszintén MP célmolekulái között azonosítottam.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

1. Czakó-Vér, K., Koósz, Zs., **Antal, J.**, Rácz, T., Sipiczki, M. and Pesti, M. (2004) Characterization of chromate-sensitive and -tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Folia Microbiologica* 49, 31-36. (IF: 0.979)
2. **Antal, J.**, Zongliang, X., Benko, Z., Zhiqiang, D., Shi, F., Liu, K., Pesti, M., Wang, D. and Zhao, R., Y. (2011) BYDV MP is a viral determinant for retarded plant growth, cell cycle G<sub>2</sub>/M arrest and mitotic abnormality (in manuscript)
3. **Antal, J.**, Pesti, M. (2005) The dose-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress response promotes increased survival for *Schizosaccharomyces pombe* cells expressing HIV-1 Vpr *Folia Microbiologica* . (IF: 0.979)
4. Koósz, Zs., Gazdag, Z., Miklós, I., Benkő, Z., Belágyi, J., **Antal, J.**, Melegh, B., Pesti M. (2008) *Effects of Decreased Specific Glutathione Reductase Activity in a Chromate-Tolerant Mutant of Schizosaccharomyces pombe*. *Folia Microbiologica* 53, 308-314. (IF: 0.979)

### A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadások és poszter kivonatok

1. Czakó-Vér, K., Koósz, Zs., **Antal, J.**, Grama, L. and Pesti, M. (2003): Investigation of chromium-tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe* by cytometry and tetrad analysis. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, 48: 161.
2. **Antal, J.**, Pesti, M. (2005) *Conspiracy theory on MAPK pathway elements as inhibitors of HIV-1 Vpr protein*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52, pp. 31st CEFORM Keszthely, Hungary
3. **Antal, J.**, Xia, Z., Benkő, Zs., Du, Z., Shi, f., Liu, K., Pesti, M., Wang, D., Zhao, R., Y. (2005) *movement protein of plant pathogenic BYDV causes mitotic abnormalities and cell cycle arrest in fission yeast*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52, pp. 31st CEFORM Keszthely, Hungary

**Egyéb konferencia absztraktok**

1. Czakó-Vér, K., Koósz, Zs., **Antal, J.**, Grama, L. and Pesti, M. (2001) *Króm-toleráns Schizosaccharomyces pombe mutánsok jellemzése áramlási citometriával és tetrád analízissel*. Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Naggyűlése Balatonfüred, Hungary, pp. 26.
2. **Antal, J.**, Xia, Z., Benko, Z., Fenyvesvolgyi, Cs., Du, Z., Shi, Z., Liu, K., Yu, M. (2004) *BYDV MP is a Viral Determinant for Retarded Plant Growth as Results of Cell Cycle G<sub>2</sub> Arrest and Mitotic Abnormality*. 3<sup>rd</sup> International Fission Yeast Meeting, San Diego, U.S.A.
3. **Antal, J.**, Pesti, M. (2005) *Conspiracy theory on MAPK pathway elements as inhibitors of HIV-1 Vpr protein* 1<sup>st</sup> Central European Forum for Microbiology (CEFORM), Keszthely, Hungary