

2. year:

Az elért eredmények rövid ismertetése:

A tervezett kutatás fő célja a kutatócsoport által korábban leírt polifunkcionális sep gének funkcionális analízise volt a *Schizosaccharomyces pombe* nevű egysejtiesen szaporodó élesztőfajban. A sep génekben bekövetkezett mutációk hatására a sejtek elvesztik azt a képességüket, hogy a citokinezis végén egymástól elváljanak és hífára emlékeztető sejtláncokat hoznak létre. A mutánsok többsége azonban nem csak szeparációs defektusokkal rendelkezett, hanem fokozottan érzékenyvé vált bizonyos stresszhatásokra és elvesztette a szexuális konjugáció képességét is. A komplex fenotípusok alapján feltételezhető volt, hogy a gének által kódolt fehérjék többféle funkciót is ellátnak a sejten belül. A jelenlegi pályázat keretében a sep1 és sep15 gének analízisének folytatása, valamint a már klónozott, de még részletesebben nem vizsgált sep9, sep10 és sep11 gének funkcióinak keresése valósult meg.

Az elérendő célt hat, egymással átfedő részfeladat keretében valósították meg. A legfontosabb eredmények az alábbiakban foglalhatók össze.

1. A sep1 gén által kódolt forkhead-típusú transzkripciós faktor regulációs szerepének jobb megismerése. A transzkripciós faktorok a citoplazmában szintetizálódnak, de a sejtmagban fejtik ki hatásukat, ahol a célgének működését szabályozzák. Amennyiben a működésükre nincs állandóan szükség, aktivitásuk időzítése többféle módon is történhet. Egyik lehetőség a transzkripciós szintű szabályozás. Ebben az esetben a faktort kódoló gén csak akkor kerül átírásra, amikor a faktorra szükség van. A sep1-nél ez a lehetőség kizárható, mivel a sep1 mRNS konstitutívan termelődik a sejtben. Valószínűbbnek tűnik a poszttranszkripciós-poszttranszlációs szabályozás. Itt is többféle lehetőséggel lehet számolni. Számos transzkripciós faktor a citoplazmában tartózkodik és csak akkor kerül be a magba, amikor szükség van a működésére. Ennek a lehetőségnek a vizsgálata érdekében a sep1 gént expressziós vektorba helyezték, ahol fúzionáltatták GFP és HA tag-ekkel. Mindkét tag felhasználható a vele összeépített fehérje nyomonkövetésére. A GFP fluoresszkálóvá teszi a fehérjét, amitől az a sejt rész fog fluoresszkálni a fluoresszcens mikroszkópban, amelyben felhalmozódik a fehérje. A HA ugyan nem fluoresszkál, de a hozzá specifikusan kötődő antitest képes fluoresszkálni. A két módszer alkalmazása azonos eredményhez vezetett: a Sep1p fehérje a sejtmagban halmozódik fel. A sejtciklus minden fázisában jelen van a magban és a mennyisége lényegében azonos. Tehát a működését nem a citoplazma-mag közötti transzport szabályozza. Tekintettel arra, hogy a Sep1p aktivitására csak az M-fázis végén, a citokinezis során van szükség, fel kell tételezni, hogy legalább kétféle magi formája lehetséges, amelyek közül csak az egyik lehet aktív. Sok fehérje aktivitása a foszforiláltsági állapottól függ. Valószínűleg a Sep1 esetében is erről lehet szó. A szekvencia elemzése ugyanis számos potenciális foszforilálási helyet mutatott ki, közöttük olyat is, amelyet a sejtciklus szabályozásában központi szerepet játszó Cdc2p kináz ismer fel. Ezzel az eredménnyel teljes összhangban sikerült is identifikálni egy foszforilált és egy foszforilálatlan változatot a Sep1p fehérjéből a sejteken belül. Sőt kiderült, hogy a foszforilált állapot csak a mitózis táján mutatható ki. Mindezek alapján nagyon valószínűnek látszik, hogy a Sep1p transzkripciós faktor egy foszoprotein, amely a foszforilálással válik aktívvá az M-fázis elején. Ennek egyértelmű bizonyítása érdekében elkezdődtek azok a vizsgálatok, amelyek in-vitro mutagenézissel megszüntetik a potenciális foszforilálási helyeket. A konstrukciók egy része elkészült és folyamatban vannak a tesztelesek. Ezek a kísérletek viszont már nem képezték a jelenlegi OTKA pályázat tárgyát. Szilágyi Zsolt ifjúsági pályázata keretében kerülnek befejezésre a közeljövőben.

A fenti vizsgálatokkal párhuzamosan elindult a Sep1p targetjeinek a keresése. Spanyol

együttműködés keretében elvégzett genom szintű transzkripciós profilings (c-DNS microarray) segítségével sikerült kimutatni, hogy a Sep1p egyik targetje az ace2 gén, ami szintén transzkripciós faktort kódol. Az ace2 mutáns transzkripciós profilingsja hét olyan gént azonosított, amelyek átírásához szükséges az Ace2p: adg1, adg2, adg3, cfh4, agn1, eng1 és mid2. Elkészült valamennyi gén deléciója is. A deléciós mutánsok fenotípusa alapján megállapítható volt, hogy a sejtszeptációhoz elsősorban az Agn1p és az Eng1p szükséges. Az előbbi α -glukanáz, az utóbbi pedig β -glukanáz. Szerepük lényege az, hogy részlegesen feloldják az utódsejtek közötti szeptum illetve sejtfal anyagát, amitől az utódsejtek fizikailag elválhatnak egymástól. A spanyol partnerrel közösen publikált közleményben számos további értékes adat szerepel a két glukanáz sejten belüli mozgásáról, de azok a kísérletek nem tartoznak a jelenlegi pályázat témakörébe és nagyrészüket a spanyol partner végezte el.

2. A sep10 és sep11 gének molekuláris jellemzése. Korábbi munkája során a kutatócsoport mindkét gént klónozták, szekvenálták és hasonlóságot mutatott ki a kódolt fehérjék és más fajokban található fehérjék között. Az utóbbiak a Mediátor komplexek részei voltak. A Mediátor egy olyan, sok alegységből álló transzkripciós regulátor, amely kapcsolatot hoz létre a génspecifikus transzkripciós faktorok és a Polimeráz II komplexe között. A hasonlóság alapján feltételezhető volt, hogy a Sep10p és a Sep11p fehérjék a *S. pombe*-ben működő Mediátor alegységei lehetnek. A debreceni vizsgálatokkal párhuzamosan egy svéd laboratóriumnak sikerült izolálnia a Mediátort ebből a fajtából és az alegységei között meg is találta úgy a Sep10p-t mint a Sep11p-t. Debrecenben időközben sikerült mindkét gén esetében elvégezni a génmegszakítást. Egyik gén sem bizonyult esszenciálisnak, mivel a megszakításos allélek nem voltak letális hatásúak. Létrehoztak túltermeléses konstrukciókat is szabályozhatóan működtethető nmt promotert hordozó plazmidon. Egyik fehérje túltermelése sem okozott fenotípusos változásokat. Ebből arra lehetett következtetni, hogy egyik fehérjének sincs aktivitása önmagában. Szerepüket csakis más fehérjékkel összekapcsolódva (pl a Mediátoron belül) fejtik ki, és ha a kapcsolódó partnerek nincsenek túltermelve, akkor nem várható fenotípusos változás. A sep10-ből létrehoztak deléciós allélt is, amire az alábbiakban bemutatásra kerülő transzkripciós profilings-hoz volt szükség.

3. A sep15 gén további molekuláris elemzése. Ez a gén is Mediátor-alegységet kódol, de a szerepe fontosabbnak tűnik mint a másik két Mediátor-alegységet kódolóé. Korábbi vizsgálata alapján a kutatócsoport számára már ismert volt, hogy a gén teljes inaktiválása halálos a sejtre. Viszont rendelkeztek olyan mutánsokkal, amelyek életképesek voltak. Valószínűnek látszott, hogy ezekben a mutánsokban csak részleges funkcióvesztés következett be. Ennek kiderítése érdekében amplifikálták az egyik hőmérséklet-érzékeny allélt és meghatározták a nukleotidsorrendjét. Kiderült, hogy egyetlen pontmutációt tartalmazott az első exon-intron határon. A mutáció helyéből arra lehet gondolni, hogy a sejtben hibásan játszódik le a splicing. RT-PCR-rel sikerült is kimutatni kétféle sep15 RNS-t: intront tartalmazót és intron nélkülit. A két változat nagyjából azonos mennyiségben volt jelen. A vad típusban csak nagyon kevés éretlen (intront tartalmazó) RNS fordult elő. A kapott adatokból arra lehet következtetni, hogy a mutáns azért életképes, mert képződik benne normális Sep15 fehérje is a hibás mellett. A mutáns fehérje kisebb, mint a vad típusú, mivel az intron bennmaradása kereteltelődést okoz az intront követő exonban, aminek következtében egy korai stop-kodon alakul ki messze az RNS vége előtt. A gén vad és mutáns változatát is megjelölték fluoreszkáló GFP tag-gel, ami láthatóvá tette a fúziós fehérjét a sejtben. Mind a mutáns mind a vad típusú fehérje a magban halmozódott fel, vagyis a magba történő transzport hatékonyságát nem befolyásolta a hibás fehérje jelenléte. A mutánsban megvizsgálták a mag és a tubulin illetve actin váz szerveződését. Mindhárom esetben jelentős eltéréseket figyeltek meg a normálistól, de a sejtek nem mutattak egységes fenotípust.

Valószínűleg arról van szó, hogy a pontatlanul működő Mediator sok gén működésében okoz zavart. Közöttük természetesen azokat is, amelyek a sejtszeparációhoz kellenek.

4. A Sep10 és a Sep15 Mediátor alegységek célgénjeinek az identifikálása. Más fajokból származó adatokból arra lehet következtetni, hogy a Mediátor valószínűleg majdnem minden olyan gén transzkripciójánál közrejátszik, amelyet a Polimeráz II ír át. Ha a *S. pombe*-ben ez lenne a helyzet, akkor bármely Mediátor-alegységének a hiánya nagyjából azonos fenotípushoz vezetne. Ezzel szemben a három sep gén mutánsai sokban különböznek egymástól. Az egyedüli közös defektusuk a sejtszeparáció hiánya. A különbségeik arra utalnak, hogy a három fehérje eltérő géncsoportok átírásában vesz részt. Ennek kiderítésére transzkripciós profilínggel összehasonlították a mutáns és a vad sejtekben termelődő mRNS szinteket mindkét génnél. A vizsgálatokhoz cDNS microarrayeket használtak. Mindkét gén mutációja 200-at meghaladó további gén aktivitását változtatta meg, de a befolyásolt gének zöme nem volt azonos. Az átfedés mindössze 22% volt. A sejtszeparációban fontos szerepet játszó enzimeket kódoló *eng1* és *agn1* az átfedő csoportban volt, ami megmagyarázza, hogy miért van a *sep10* és a *sep15* génben sérült mutánsoknak egyforma sejtszeparációs defektusa. A változás általában a transzkripció csökkentését jelentette, de voltak olyan gének is, amelyeknél az aktivitás felfokozódott a sep gének kiiktatását követően. A kapott adatok alapján meglehetősen komplex kép rajzolódik ki. A Sep10p és Sep15p fehérjék valószínűleg kooaktivátorként vesznek részt a befolyásolt gének többségénél. Viszont nem minden befolyásolt génnél játszanak közvetlen szerepet. Főleg azoknál a géneknél lehet közvetett részvételre gondolni, amelyek aktivitási szintje megemelkedik, ha a *sep10* vagy a *sep15* gén inaktív. Esetükben feltételezhető, hogy a Sep fehérjék nem az ő transzkripciójukban, hanem az ő aktivitásukat befolyásoló regulátorok (pl. represszorok) transzkripciójában vesznek részt. A microarrayes hibridizációkat egy angol laboratóriummal együttműködve végezték, mert így olcsóbban jutottak hozzá a *S. pombe* microarrayekhez, amik akkor még nem voltak elérhetőek kereskedelmi forgalomban. A pályázati időszak alatt elért eredmények tulajdonképpen több távlatot nyitottak meg, mint amennyi kérdésre választ adtak ennél a két génnél. A folytatás érdekében 2006-ban újabb támogatásért folyamodott a kutatócsoport az OTKA-hoz.

5. A *sep9* funkcionális elemzése. A pályázati támogatást megelőzően márt sikerült a *sep9* gént klónozni és szekvenálni. A kódolt fehérje nagyfokú hasonlóságot mutatott a *Saccharomyces cerevisiae* Spt8p fehérjéjével. Az Spt8p az úgynevezett SAGA komplex része, amely feladata a DNS "kicsomagolása" a hisztonból a transzkripciót megelőzően. Enélkül nem valósulhatna meg a transzkripció, mivel a Polimeráz II nem férne hozzá a génhez. A jelenlegi pályázat keretében sikerült pontosan meghatározni a gén elejét a megfelelő cDNS klónozásán keresztül. A továbbiakban sor került a gén deléciójára, ami nem volt halálos. A túltermelést is sikerült megoldani nmt promoterrel törtét fúzió segítségével. Ennek nem volt semmilyen fonotípusos hatása. A *Saccharomyces cerevisiae* SPT8 génje komplementálta a *sep9* deléció fenotípusát. Természetesen nem a saját promotere segítségével, hanem egy *S. pombe* expressziós vektorba építve. Az SPT8 aktivitása a *S. pombe*-ben jól bizonyítja, hogy az SPT8 és a *sep9* egymás funkcionális homológjai. Ezeknek a vizsgálatoknak az ad különös jelentőséget, hogy a *S. pombe*-ben mindeddig még nem vizsgálták a SAGA komplex megfelelőjét.

6. A projekt célkitűzésein felüli eredmények. A projekt céljai között eredetileg nem szerepelt a *S. pombe* két további forkhead fehérjéjét kódoló génjének a vizsgálata. A *S. pombe* genomjában található két olyan ORF, amelyek a *sep1*-hez hasonlóan fork-head típusú DNS-kötő doménnel rendelkező fehérjéket kódolnak. Felmerült, hogy ezek a fehérjék a Sep1p-hez

hasonló funkciókkal rendelkeznek. A kérdés tisztázása érdekében ezekből a génekből is létrehoztak mutáns alléleket. Egyik mutáció sem váltott ki jelentős sejtszeparációs hibát, de mindkettő szintetikus fenotípust okozott a *sep1* mutációjával kombinálva. Az adatokból arra lehetett következtetni, hogy ezeknek a géneknek nincs lényeges szerepe a sejtszeparáció szabályozásában, de hozzájárulhatnak a folyamat "finom" szabályzásához. A jövőben érdemes lenne ezt a vonalat is tovább vizsgálni. Hasonlóképpen terven felül került sor a fehérjék O-mannozilációjában szerepet játszó *oma* gének vizsgálatára. Érdekes módon ezek mutációja is sejtszeparációs defektusokkal jár. Egyelőre nem világos, hogy van-e kapcsolat a *sep* gének és az *oma* gének funkciói között.

7. A fentiekben összefoglalt eredmények alapján a következő model állítható fel. A *Sep1p* fork-head típusú transzkripciós faktor központi szerepet játszik az M-fázis számos eseményének regulálásában, többek között a sejtszeparációs gének aktivizálásában. Az utóbbi szerepét nem közvetlenül, hanem az *ace2* gén szabályozásán keresztül látja el. Az *Ace2p* is egy transzkripciós faktor, amely legalább hét olyan gén átírásához kell, amelyek termékei közvetlenül részt vesznek a szeparációs folyamatban. Az *Ace2p* működését segítik a *Sep10p* és *Sep15p* Mediátor-alegységek, mint transzkripciós kofaktorok. Hasonlóképpen segítő szerepe van a *Sep9p*-nek, ami valószínűleg egy olyan komplex része lehet, amely hasonlít a *Saccharomyces cerevisiae* kromatin-átrendeződést biztosító SAGA komplexéhez.