

Szakmai Zárójelentés

A projekt fő célkitűzései:

1. A sep1 protein szabályozásában szerepet játszó mechanizmusok feltárása és a target gén transzkripciójának szabályozására való hatásának vizsgálata.
2. A sep1 génnel/proteinnel funkcionális kölcsönhatást mutató egyéb gének megismerése, és azok sep1-el való kölcsönhatásainak vizsgálata.

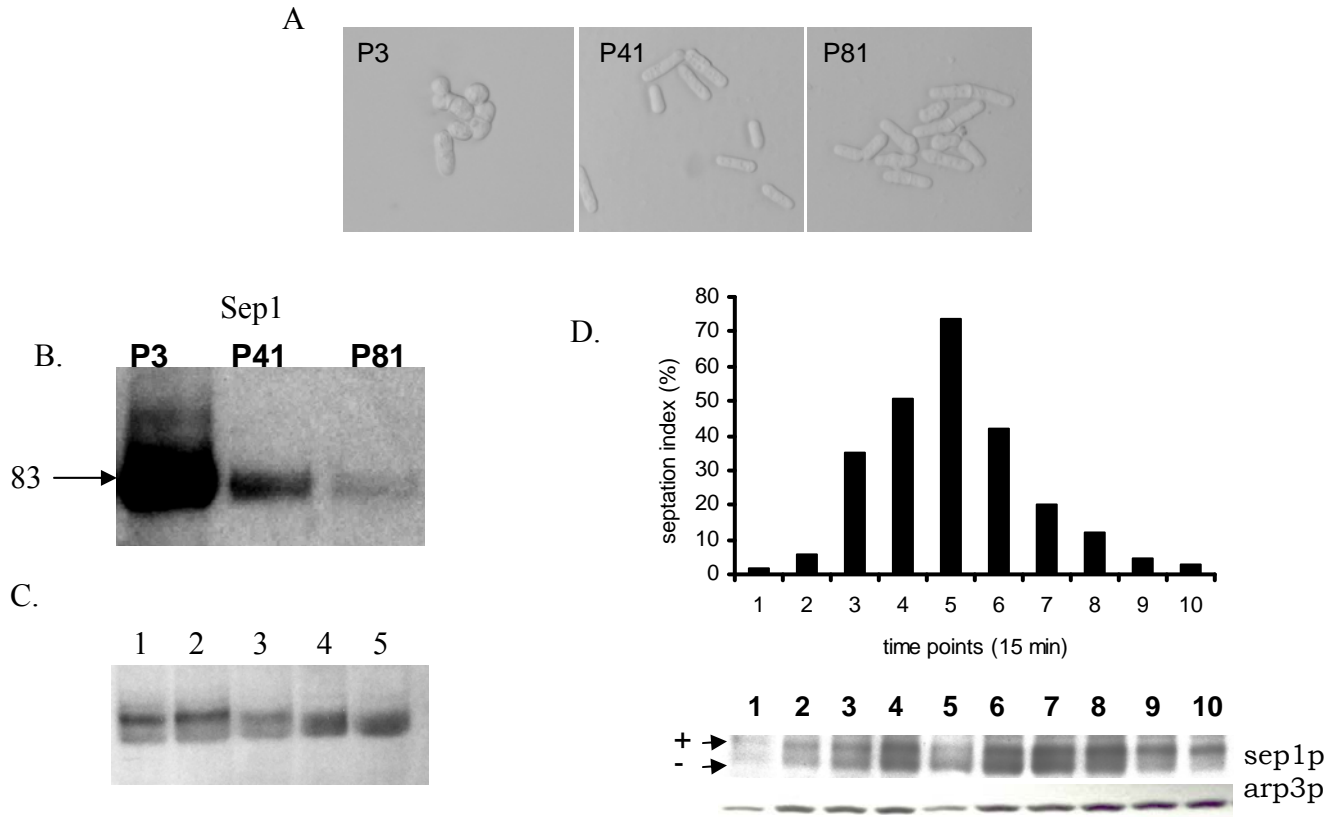
A kutatási beszámolóban e két főbb célkitűzés mentén foglalom össze az elért eredményeket.

1. A sep1 protein szabályozásában szerepet játszó mechanizmusok feltárása és a target gén transzkripciójának szabályozására való hatásának vizsgálata.

A sep1 protein foszforilált a sejtekben és foszforilációja változik a sejtciklus során

Korábbi vizsgálatok (Ribar, Grallert et al. 1999; Zilahi, Salimova et al. 2000) valószínűsítették, hogy a sep1 protein szabályozásában szerepet játszhatnak posztranszlációs mechanizmusok. Ennek vizsgálatára kidolgoztunk egy olyan rendszert, amellyel a sep1 proteint tudtuk detektálni. Ehhez sep1 fúziós proteint állítottunk elő a sep1 kromoszómális lókuszt megváltoztatásával. A fúziós proteint indukálható promoterral működtettük, így 3-féle konstrukcióval háromféle erősségű sep1 proteinszintet tudunk kialakítani. Fenotípus és mikroszkópikus vizsgálatok megmutatták, hogy a P41 promoterral expresszáltatott sep1 protein vad típusú fenotípust mutatott (lásd 1A. ábra), így ezekkel a típusú sejtekkel dolgoztunk tovább. A sejtől vett proteinmintából Western blott segítségével kimutattuk a sep1p proteint, a hozzá fuzionált kis molekulatömegű epitópot („tag”) felismerő antitesttel, az expressziós szintnek megfelelő proteinszinttel a 3-féle erősségű promotert tartalmazó sejtekből (1B. ábra). E vizsgálatok megmutatták, hogy a sep1 protein kétféle molekulatömegű formaként van jelen a sejtekben, amelyek mennyisége eltérő. Ez felvetette a posztranszlációs módosítás lehetőségét, amely a sep1-hez hasonló regulátorok esetében legtöbbször foszforiláció. Izolált sep1 proteinen elvégzett foszfatáz kezelés ténylegesen megmutatta, hogy a sep1 lassabban vándorló formája valóban foszforilált (1C. ábra).

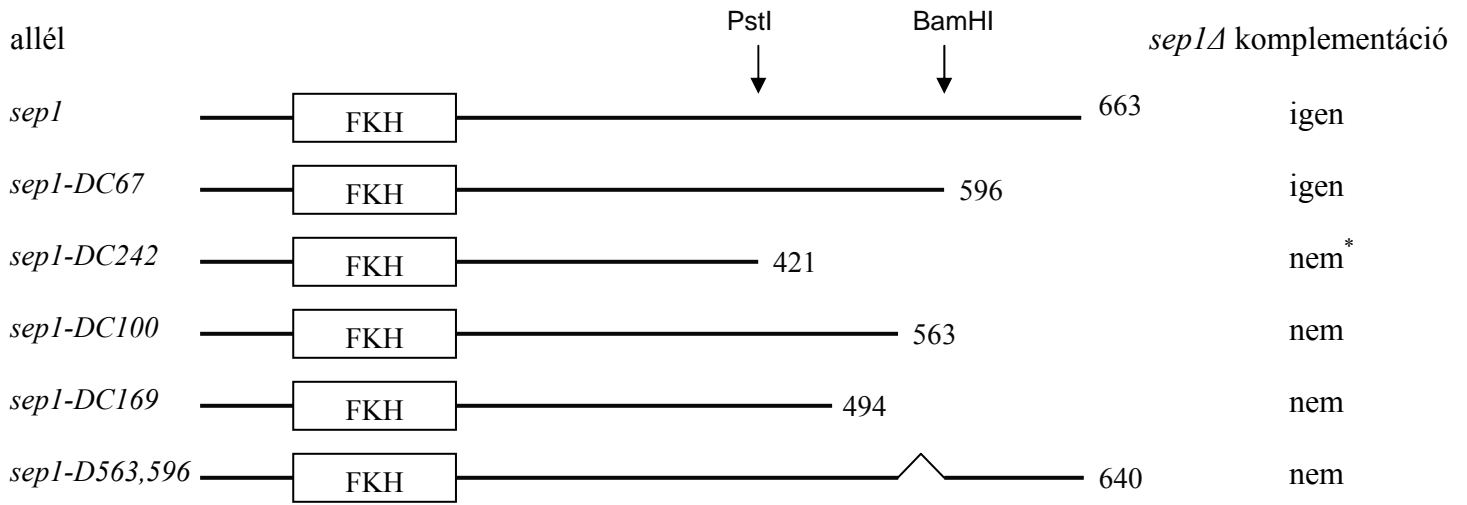
A sep1 a sejtek mitozisához és citokineziséhez szükséges gének működtetésében játszik szerepet, ezért foszforilációját is a sejtciklus ebben a fázisában váránk. Ennek vizsgálatára szinkronizált tenyészetben vizsgáltuk meg a sep1 protein foszforiláltságát. A kísérleti megközelítés előnye, hogy a szinkronizált osztódás során vett mintákból kimutatott sep1 protein foszforiláltsága időben követhető. A kísérletet elvégeztük és az eredmény (1D. ábra) azt mutatta, hogy a sep1 protein foszforiláltsága csökken, ahogy a sejtek áthaladnak a mitózison, és visszaáll, ahogy a sejtek belépnek a következő sejtciklusba. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a sep1 protein funkciójának ellátásában fontos szerepet kaphat a sejtciklusfüggő foszforiláció. A további kísérletek során azt vizsgáltuk, hogyan hat a foszforiláció hiánya a sep1p funkciójára.



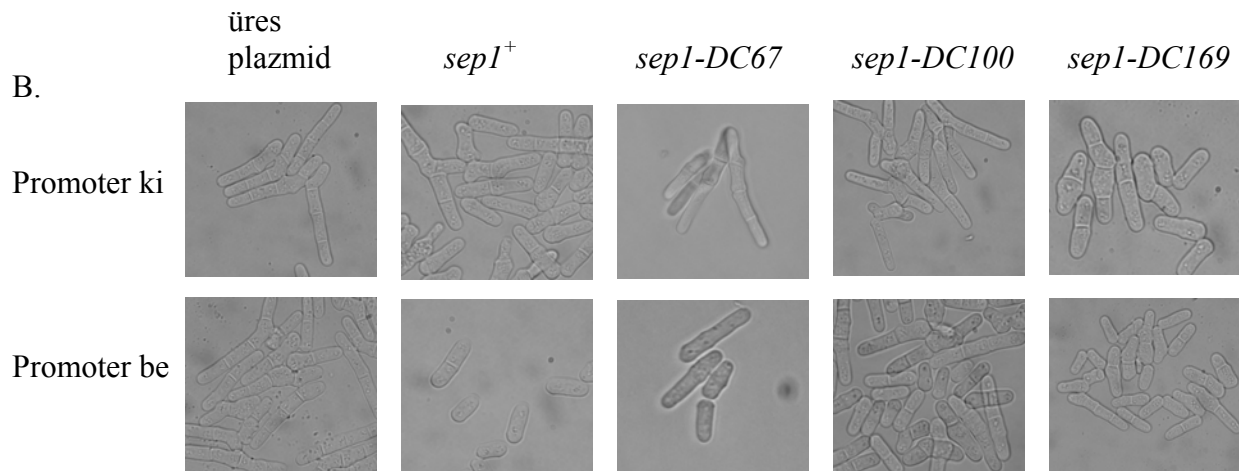
1. Ábra. A. A *sep1* fúziós protein létrehozása során megfigyelt sejt fenotípusok. B. A *sep1* fúziós protein detektálása western bloton. C. Foszfátáz esszé izolált *sep1* proteinen. 1. Foszfátáz nélkül, 2. Foszfátáz (30 u)+ inhibitorok, 3,4,5: Foszfátáz (10, 20, 30 u). D. A *sep1* foszforiláció változása a sejtciklus során szinkronizált tenyészetben. Az *arp3* (actin related protein) proteint használtuk mennyiségi kontrolnak.

A *sep1* protein C-terminális deléciói funkcióvesztéssel járnak

A *sep1* protein 663 aminosavból áll, amelyek közül bioinformatikai analízis után 58 potenciális serin, threonin és tirozin aminosav azonosítottunk. Így a lehetséges aminosavak direkt mutációs analízise rendkívül időigényes és drága stratégia, ezért azt választottuk, hogy célzott deléciók létrehozásával találjuk meg azt a régiót, amely a funkcióért felelős, bízva abban, hogy ezzel együtt a foszforiláció jelentőségéről is többet megtudhatunk. A *sep1* gén klónozása során (Ribar, Banrevi et al. 1997) megfigyelték, hogy C-terminálisan 242 aminosav deléciója funkcióvesztéssel jár. Így vizsgálataink során ezen C-terminális régió részletesebb analízisét végeztük el. Ehhez létrehoztunk olyan *sep1* allélokat, amelyek ezt a régiót szisztematikusan lefedték. A létrehozott deléciós allélokat szabályozható promoterű expressziós plazmidokba klónoztuk, és a *sep1* gén teljes delécióját tartalmazó sejtekbe transzformáltuk, így lehetőségünk volt az adott allél *sep1* funkció komplementációs képességének vizsgálatára. Továbbá a kísérleti megközelítést úgy alakítottuk ki, hogy lehetőségünk legyen a *sep1* protein foszforilációjának vizsgálatára is, a korábban már használt fúziós protein detektálása révén. Továbbá a *sep1* target gén, az *ace2* transzkripciójának vizsgálatára is. Ebben a kialakított komplex rendszerben analízáltuk a 2A. ábrán látható allélokat a következő eredményekkel.



*korábbi eredmény (Ribar et al, 1997)



2. ábra. A. Az előállított *sep1* allélok és hatásuk a *sep1* gén funkciójának komplementálására. B A különböző *sep1* allélokat tartalmazó expressziós plazmidokkal transzformált sejtek mikroszkópikus vizsgálata, a szabályozható promotert represszáló (promoter ki) valamint indukáló (promoter be) körülmények között.

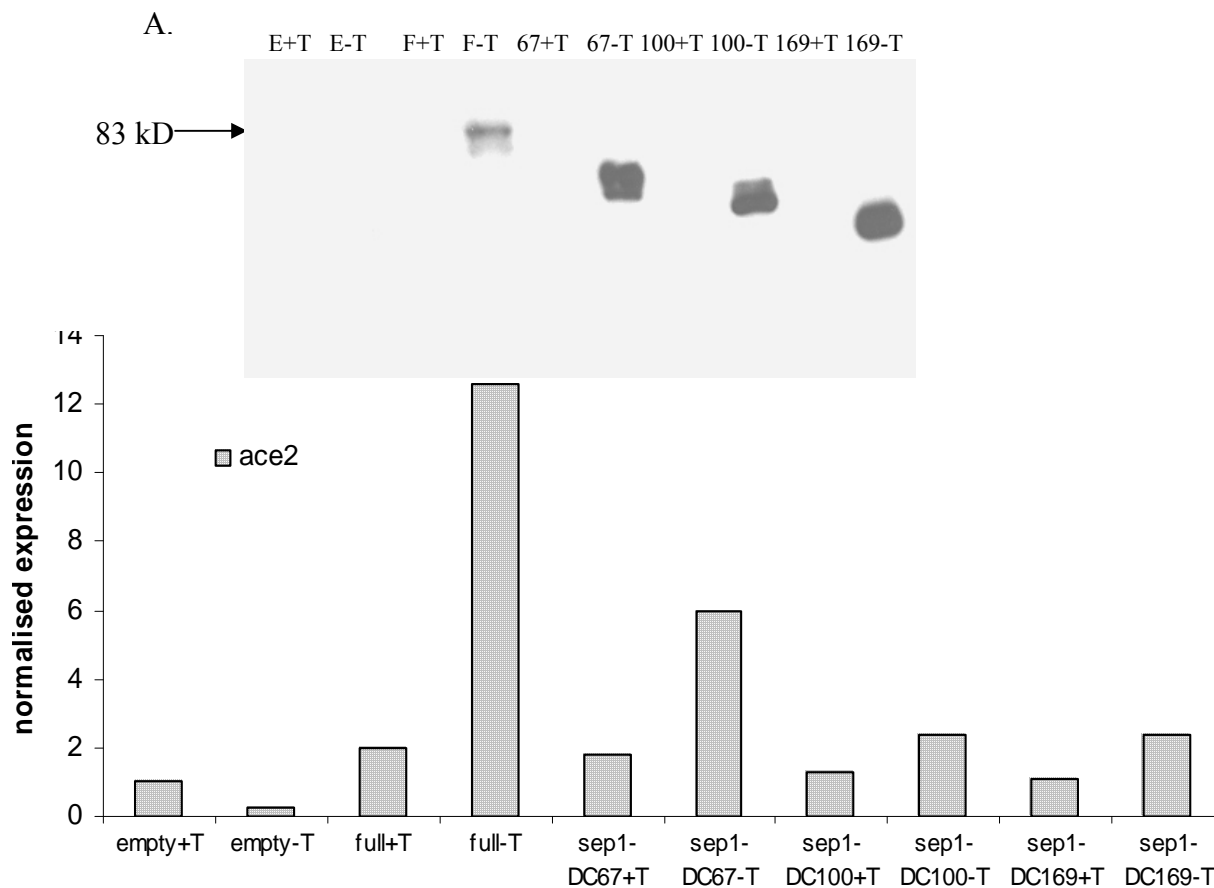
A *sep1-DC67*-es allél, amely 67 aminosav elvesztésével jár, nem okoz funkcióvesztést, míg további deléciók (*sep1-DC100* és *sep1-DC169*) nem voltak képesek komplementálni a *sep1* gén deléciójával fellépő citokinezis defektust (lásd 1B ábra).

A *sep1* funkcióvesztése együtt jár a foszforilációs mintázat megváltozásával, valamint az *ace2* target gén transzkripciójának lecsökkenésével.

Miután megmutattuk, hogyan viselkednek az egyes *sep1* deléciós allélok a *sep1* funkció komplementálásában, analizáltuk a *sep1* protein foszforilációjára gyakorolt hatásukat, valamint az *ace2* gén expressziójának megváltozását az egyes sejtekben. Az *ace2* gén a *sep1* egyik legfontosabb célgénje, amely a citokinezis egyik kulcsfontosságú regulátora (Alonso-Nunez, An et al. 2005).

A Western analízis megmutatta, hogy mind *sep1-DC100* és *sep1-DC169* allélek esetében a foszforilált forma aránya nagymértékben lecsökkent. Ez nem volt megfigyelhető a *sep1-DC67*-es allélnál (3.ábra). Ez az eredmény megmutatta, hogy a *sep1p* funkcióvesztése együtt jár a foszforilált forma elvesztésével és megerősítette korábbi hipotézisünket, miszerint a foszforiláció fontos a *sep1* protein funkciójának ellátásához.

A továbbiakban meghatároztuk, hogy a funkcióvesztés hogyan hat az *ace2* target gén expressziójára. Mint az a 3B ábrán látható, a target gén expressziója teljesen megszűnik a *sep1-DC100* illetve *sep1-DC169* esetében. Érdekes, hogy ugyan a *sep1-DC67* nem okoz citokinetikus defektust és nem változtatja meg a foszforilációs mintázatot, a target gén expressziójára hatással van. Ez azt jelentheti, hogy az utolsó 67 aminosavnak szerepe van az optimális transzkripció szint elérésében, de szerepe valószínűleg marginális.

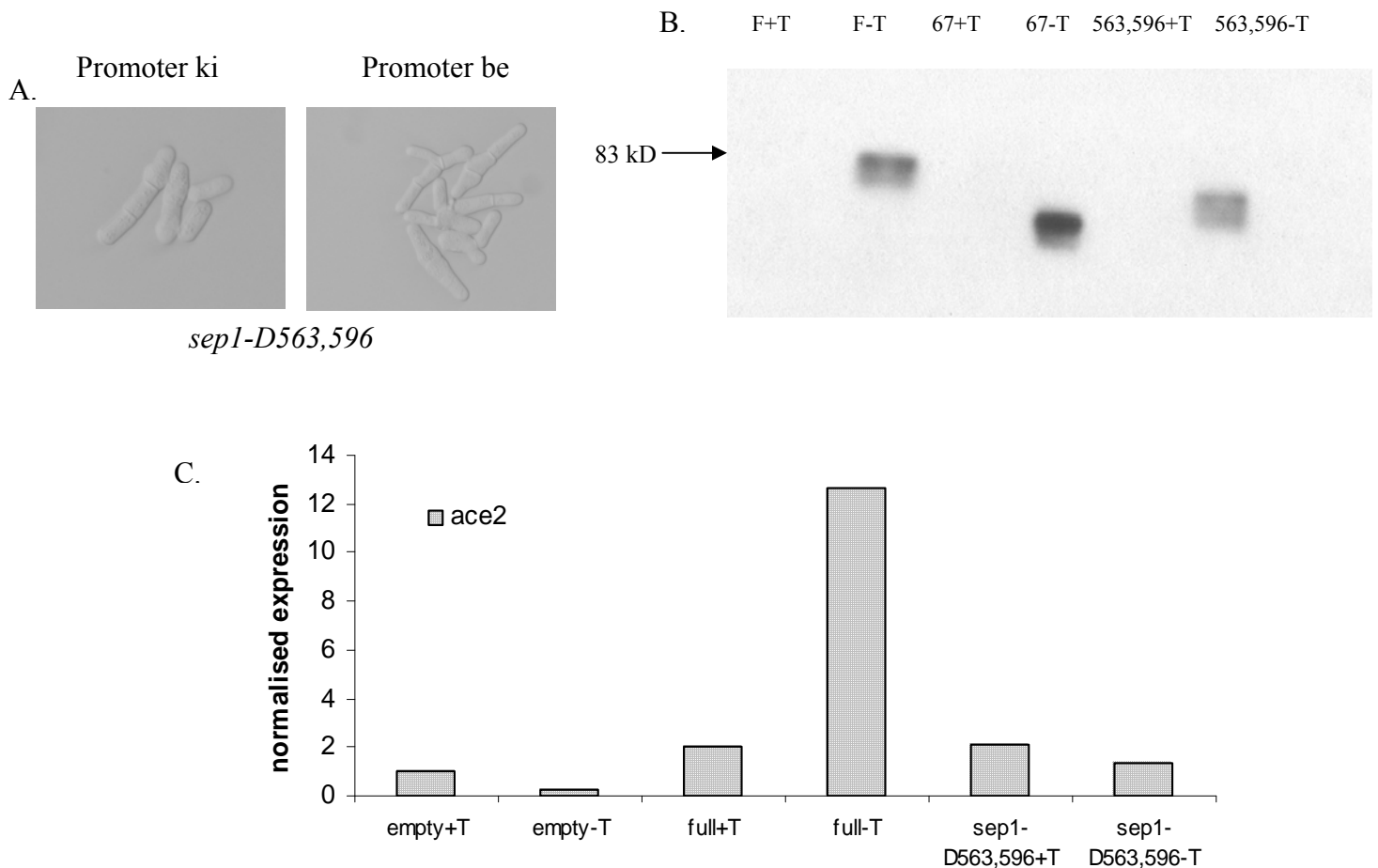


3. ábra a. Az egyes *sep1* allélok hatása a protein foszforilációs mintázatára. Az egyes transzformált sejtekből a fúziós proteint detektáltuk promotor ki (+T) és promotor be (-T) feltételek között. E: üres plazmid, F: teljes *sep1* gén. B. Az *ace2* gén expressziójának mértéke az egyes mintákban.

A *sep1p* 563.dik és 596.-ik aminosavjai közötti régiójának deléciója elrontja a *sep1* funkciót, de nincs lényeges hatással a foszforilációra.

A korábbi eredmények az mutatták, hogy 67 aminosav C-terminális deléciója nem, míg 100 aminosav deléciója elrontja a *sep1* gén funkcióját. Így feltételeztük, hogy a két allél közötti 25 aminosavnyi régiónak fontos szerepe lehet a *sep1* funkcióban. Ezért ezt a régiót eltávolítottuk (*sep1*-D563,596 allél) és vizsgáltuk szerepet a korábban részletezett módon. Érdekes módon, ez az allél nem volt képes a *sep1* funkció komplementációjára (lásd 4A. ábra) és az *ace2* gén expressziója is alacsonynak adódott (4c ábra). Azonban nem találtunk lényeges változást a foszforilációs mintázatban a korábbiakkal összehasonlítva (4B ábra).

Ez alapján valószínűsíthető, hogy a *sep1* funkcióban és a transzkripció aktiválásban a foszforiláción kívül egyéb mechanizmusok (kölsönhatás egyéb génekkel, proteinekkal) is szerepet játszhatnak. A kutatás második részében sikerült is találnunk ilyen kölsönható partnereket.



4.ábra. A. A *sep1*-DC563,596 allél nem képes a *sep1* funkció ellátására. B. A protein foszforiláció az egyes mintákban C. Az *ace2* transzkripciója az egyes mintákban. E: üres plazmid, F: teljes *sep1* gén. +T: represszált, -T: indukált körülmények

2. A *sep1*-el funkcionális kölcsönhatásban álló egyéb gének vizsgálata.

Ahhoz, hogy az eukarióta sejtekben konzervatív és a hasadó élesztőben a *sep1* által is szabályozott sejtciklus függő transzkripció molekuláris mechanizmusát megismerjük, a kutatási projekt során kölcsönható gének felkutatását is célul tűztük ki. Ezt a kutatási feladatot a vállaltakon kívül még egy feladattal ki is egészítettük (b. rész), amelynek során további kölcsönható partnereket találtunk.

a. A *sep1*-el feltehetően kölcsönható egyéb fork head típusú transzkripciós faktorok jellemzése hasadó élesztőben

A fork head típusú transzkripciós faktorok az élesztőtől az emberig számos szervezetben megtalálhatóak és szinte mindenhol kulcsfontosságúak különböző sejtosztódási és sejt differenciálódási folyamatokhoz szükséges gének expressziójának szabályozásához (Lehmann, Sowden et al. 2003). Hasadó élesztőben két ilyen típusú transzkripciós faktor volt ismert a kutatási projekt kezdete előtt. Ezek egyike a *sep1*. Ezért célul tűztük ki további, a genomszekvencia ismeretében előbukkant két további fork head protein funkciójának jellemzését, bízva abban, hogy ezzel a sejtciklusban érintett, a *sep1*-el feltehetően kölcsönható újabb regulátorokat sikerül azonosítani. Ehhez elkészítettük a gének delécióját és annak részletes fenotípusos és citológiai vizsgálatát végeztük el. Az eredmények azt mutatták, hogy az egyik gén (*fkh2*) deléciója sejtosztódási ciklus zavarait okozza. Kimutattuk, hogy a *fkh2* hiányában a sejtek nehezebben indukálják a mitózist, ezáltal megnő a G2-ben "rekedt" sejtek száma, amelyet citológiai vizsgálatokkal megerősítettünk. Ezzel sikerült egy olyan regulátort azonosítanunk amely a *sep1*-hez hasonló funkciót lát el (Szilagyi, Batta et al. 2005). Más laboratóriumok később kimutatták a *sep1* és *fkh2* proteinek közötti direkt fizikai kölcsönhatás van, ezzel megerősítve a mi eredményeinket (Papadopoulou, Ng et al. 2008).

b. A *sep1* és a mediator komplex kölcsönhatása.

A Mediator komplex az élesztőtől a növényeken át az emberig megtalálható nagyjából 1 Megadalton tömegű és legalább 25 alegységből álló komplex, amely a transzkripció szabályozásában vesz részt. A jelenlegi modellek alapján a Mediator az RNS polimeráz II és a speciális transzkripciós faktorok (pl. *sep1* vagy *fkh2*) között közvetíti a szabályozási szignált, mindkettővel kölcsönhatásban. Azonban ezen funkció részletei és a folyamat molekuláris mechanizmusa nem ismert.

Korábbi kutatásunk során azonosítottunk a Mediator komplex egyes alegységeinek mutációja révén kialakuló, *sep1*-hez hasonló fenotípusú sejteket, ami a gének funkcionális kölcsönhatására utalt (Zilahi, Miklos et al. 2000; Szilagyi, Grallert et al. 2002) Ez az eredmény két oldalról is izgalmas, hiszen nemcsak a *sep1* sejtosztódásban való szerepének, hanem a Mediator komplex funkciójának megértéséhez is hozzájárulnak ezek a vizsgálatok.

Így a *sep1* gén és a Mediator komplex közötti funkcionális kapcsolat részletesebb molekuláris elemzése már korábban terveink között szerepelt, de ennek protein biokémiai és genomikai technológiai háttere és a kísérletekhez szükséges magas dologi költségek miatt a projektben korábban nem tudtunk előrelépni. Azonban ezzel az OTKA kutatási projekttel időben átfedő OTKA pályázat megteremtette az anyagi lehetőséget, hogy ebben az irányban előrelépünk.

Továbbá, a svédországi Karolinska Intézetben dolgozó, a Mediator komplex funkcióját kutató csoportjával (Dr. Claes Gustafsson csoportja, lásd (Zhu, Wiren et al. 2006; Linder, Rasmussen et al. 2008) kialakult kapcsolat lehetővé tette további, a részletesebb molekuláris kapcsolatok elemzését is. A svédországi laboratórium nagyrészt biztosította a drága kísérletekhez szükséges kísérleti háttérrel, valamint az újabb laboratóriumi technikák elsajátításához szükséges szakmai segítséget.

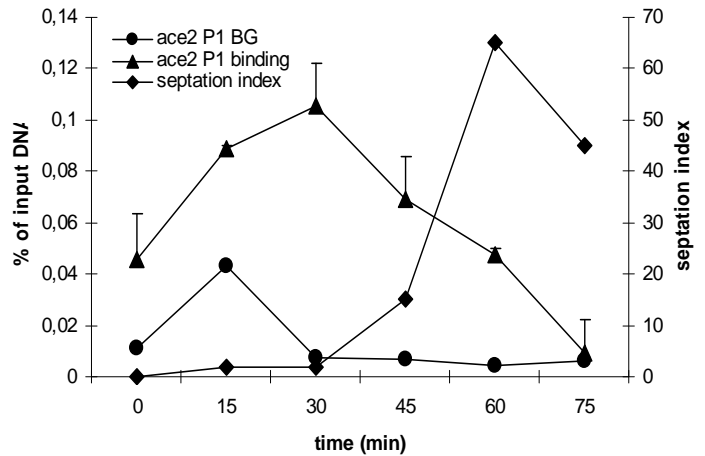
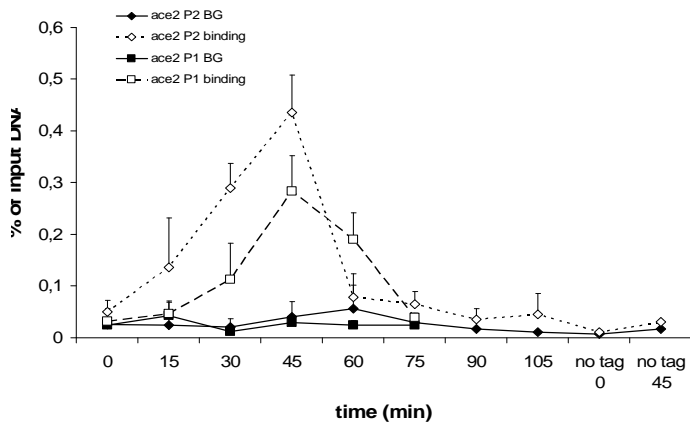
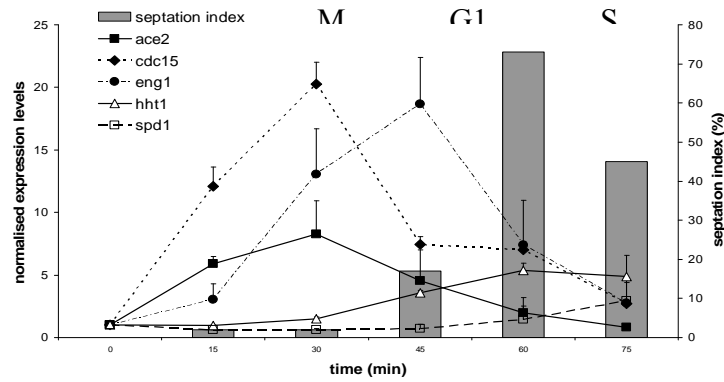
Kimutattunk, hogy a Mediator komplex befolyásolja a *sep1* által is szabályozott gének (pl. *ace2*) expresszióját, így bizonyosan direkt vagy indirekt szerepe van a *sep1* funkció ellátásában (Miklos, Szilagyi et al. 2008). Valamint, hogy mindkettő kölcsönhatásban áll a TFIIH transzkripciós komplex-el, amely szintén elengedhetetlen a transzkripcióhoz (Lee, Miklos et al. 2005). Ezen munkák megmutatták, hogy a sejtciklus függő transzkripcióban a Mediator a TFIIH komplexek funkcionálisan együttműködhetnek a *sep1* és *fhk2* génekkel a target gének promoterein. Ugyan óriási feladat ennek a komplex rendszernek a teljes vizsgálata, azonban az eredményeink ígéretesnek bizonyultak, ezért a pályázatban megfogalmazott feladatokon felül a *sep1*, *fhk2* és a Mediator komplex kölcsönhatására koncentrálnva végeztünk további kísérleteket, a Karolinska Intézet-i kutatócsoporttal együttműködve.

Megvizsgáltuk, hogy a *sep1*, valamint a Mediator komplex direkt módon kötődik-e a target gén promotéréhez. Ehhez a sejteket a fent leírt módon szinkronizáltuk és időben követtük a *sep1* illetve a Mediator komplex kötődését a promoteren kromatin immunoprecipitáció (ChIP) segítségével. Kimutattuk, hogy mindkettő a transzkripciós aktivációs maximummal átfedve van jelen a promoteren, és kötődésük sejtciklusfüggő (5.ábra).

Továbbá megmutattuk, hogy a *sep1* gén illetve a Mediator komplex Med15-os alegysége deléciója hatására a kötődés megszűnik. A Med15-os alegység homológjai számos szervezetben "antennaként" funkcionálnak a Mediator komplex és a specifikus transzkripciós faktorok közötti kölcsönhatásban (pl. (Yang, Vought et al. 2006). Tehát nagy valószínűséggel a *sep1* egyik funkciója a Mediator komplex promoterre való kötődésének elősegítése, feltehetően a Med15-os alegységgel való kölcsönhatás révén. Ebben a folyamatban a *sep1* protein aktivációjában bizonyosan a foszforiláció/defoszforiláció általi szabályozás is részt vesz. A jövőben szeretnénk felfedni ezen protein-protein kölcsönhatások szerepét és pontos formáját, valamint benne a foszforiláció funkcióját.

A

gene expression in WT



5. ábra A. A *sep1* target *ace2* és *cdc15*, valamint a G1 (*eng1*) S (*hht1*) és G2 (*spd1*) specifikus gének expressziójának követése szinkronizált tenyésztetben. Látható, hogy az *ace2* gén transzkripció maximuma 30 perc. B. A Mediator komplex kötődése *ace2* promoteren (P1 illetve P2 régiók) szinkronizált tenyésztetben. C. A *sep1*p kötődése *ace2* promoteren szinkronizált tenyésztetben. BG: háttér, antitest nélküli kontrol.

Összegzés

A kutatási projekt során egy fork head típusú regulátor funkciójának feltérképezésén dolgoztunk. A *sep1* egy olyan konzervatív folyamat, mint a sejtciklus függő transzkripció egyik regulátora, ezért funkciója molekuláris mechanizmusának megértése nagymértékben hozzájárul a sejtosztódás szabályozásának megértéséhez. A finanszírozott projekt lehetővé tette, hogy előrelépjünk a *sep1* funkció megértésében. Felfedeztük a *sep1* funkcióhoz szükséges foszforilációt és annak jelentőségét, valamint megismertük a *sep1* néhány kölcsönható partnerét, mint *fkh2* és Mediator komplex. A vállalt feladatokon felül a Mediator komplex-el való kölcsönhatás részletesebb vizsgálatára is lehetőség nyílt. A kapott eredmények egy része közlésre került (lásd közlemények jegyzéke), másik részének közlésére várhatóan 2009-ben kerül sor.

A jövőben meg jobban szeretnénk tisztázni a molekuláris kölcsönhatásokat ebben a rendszerben, úgymint a foszforiláció jelentőségét, a Mediator komplex-el való direkt kölcsönhatásban résztvevő elemeket, valamint a fkh2 szerepet a sep1 és a Mediator komplex-el való kölcsönhatásban. A kutatás felfedi a sejtosztódás szabályozásának újabb rétegeit és hozzájárul a szabályozott transzkripció molekuláris mechanizmusának megértéséhez. E hosszú és komplex kutatási feladat első részén vagyunk túl a támogatott kutatás adta lehetőség révén.

Irodalom

Alonso-Nunez, M. L., H. An, et al. (2005). "Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*." *Mol Biol Cell* **16**(4): 2003-17.

Lee, K. M., I. Miklos, et al. (2005). "Impairment of the TFIIH-associated CDK-activating kinase selectively affects cell cycle-regulated gene expression in fission yeast." *Molecular Biology of the Cell* **16**(6): 2734-45.

Lehmann, O. J., J. C. Sowden, et al. (2003). "Fox's in development and disease." *Trends Genet* **19**(6): 339-44.

Linder, T., N. N. Rasmussen, et al. (2008). "Two conserved modules of *Schizosaccharomyces pombe* Mediator regulate distinct cellular pathways." *Nucleic Acids Res* **36**(8): 2489-504.

Miklos, I., Z. Szilagy, et al. (2008). "Genomic expression patterns in cell separation mutants of *Schizosaccharomyces pombe* defective in the genes *sep10* (+) and *sep15* (+) coding for the Mediator subunits Med31 and Med8." *Mol Genet Genomics* **279**(3): 225-38.

Papadopoulou, K., S. S. Ng, et al. (2008). "Regulation of gene expression during M-G1-phase in fission yeast through Plo1p and forkhead transcription factors." *J Cell Sci* **121**(Pt 1): 38-47.

Ribar, B., A. Banrevi, et al. (1997). "*sep1+* encodes a transcription-factor homologue of the HNF-3/forkhead DNA-binding-domain family in *Schizosaccharomyces pombe*." *Gene* **202**(1-2): 1-5.

Ribar, B., A. Grallert, et al. (1999). "Deletion of the *sep1(+)* forkhead transcription factor homologue is not lethal but causes hyphal growth in *Schizosaccharomyces pombe*." *Biochem Biophys Res Commun* **263**(2): 465-74.

Szilagy, Z., G. Batta, et al. (2005). "Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation." *Gene* **348**: 101-9.

Szilagyi, Z., A. Grallert, et al. (2002). "The Schizosaccharomyces pombe genes sep10 and sep11 encode putative general transcriptional regulators involved in multiple cellular processes." Molecular Genetics & Genomics: MGG **268**(4): 553-62.

Yang, F., B. W. Vought, et al. (2006). "An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis." Nature **442**(7103): 700-4.

Zhu, X., M. Wiren, et al. (2006). "Genome-wide occupancy profile of mediator and the Srb8-11 module reveals interactions with coding regions." Molecular Cell **22**(2): 169-78.

Zilahi, E., I. Miklos, et al. (2000). "The Schizosaccharomyces pombe sep15+ gene encodes a protein homologous to the Med8 subunit of the Saccharomyces cerevisiae transcriptional mediator complex." Current Genetics **38**(5): 227-32.

Zilahi, E., E. Salimova, et al. (2000). "The S. pombe sep1 gene encodes a nuclear protein that is required for periodic expression of the cdc15 gene." FEBS Lett **481**(2): 105-8.