



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

Doktori (Ph.D) értekezés

Szilágyi Zsolt

Debreceni Egyetem
Természettudományi Kar
Debrecen, 2002

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

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

A Debreceni Egyetem Genetikai és Molekuláris Biológiai tanszékének munkatársai izoláltak szeptum feloldásában sérült mutánsokat, amelyeket *sep* (separation) mutánsoknak neveztek el. A mutánsok egy nagy csoportjának genetikai és citológiai vizsgálata megmutatta, hogy a gének mutációi közvetett módon hatnak a citokinezisre és egyéb sejtfolyamatokra, mint az ivari differenciálódás is érintenek, jelezve, hogy a géntermékek egy széleskörű szabályozási hálózat elemei lehetnek. Ennek megfelelően a már molekuláris módszerekkel is jellemzett *sep15* gén transzkripciószabályozó funkcióval rendelkező proteint kódol.

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

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

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

Elvégeztük a *sep10* és *sep11* gének teljes inaktivációját, ami kimutatta, hogy a gének nem esszenciálisak a sejt számára, azonban magasabb hőmérsékleten már szükségesek, ami jelzi, hogy feltehetően olyan gének transzkripciójában játszhatnak szerepet, amelyek csak magasabb hőmérsékleten létfontosságúak a sejt számára. Ha a sejtben mindkét gént teljesen inaktíváljuk, akkor az letalitást okoz alacsony hőmérsékleten is, jelezve, hogy a *sep10* és *sep11* géntermékek által szabályozott géncsoportok együttes inaktíválása már halálos. Ezek a géncsoportok valószínűleg átfedik egymást.

A *sep10* és *sep11* gének ivari differenciálódásban játszott szerepével kapcsolatban kiderült, hogy mindkét gén szükséges a *ste11* által kódolt pozitív differenciálódási regulátor működéséhez, így a *ste11* a *sep10* és *sep11* gének egyik lehetséges targetje. A *ste11p* túltermelése azonban csak *sep10⁻* esetben állította vissza a helyes differenciálódási folyamatokat, *sep11⁻* esetben nem, jelezve, hogy a *sep11p* a *ste11* gén aktivációján kívül egyéb módon is befolyásolja *ste11p* vagy targetjei működését.

A doktori értekezésben összefoglalt eredmények kimutatták, hogy a *sep10* és *sep11* gének nagy valószínűséggel transzkripciós regulátor proteinekot kódolnak, szerepük van a citokinezis illetve egyes ivari differenciálódási folyamatok szabályozásában, valamint egyik lehetséges target génjük a *ste11*. A további kutatómunka célkitűzései között a *sep10p* és *sep11p* szerepének további vizsgálata szerepel, újabb target gének megismerésével. A *sep* géncsalad további tagjainak molekuláris elemzése is hozzájárulhat a sejt-folyamatokban szerepet játszó és az eddigi eredmények alapján szorosan együttműködő *sep* génekből álló szabályozási hálózat megismeréséhez.

A DOKTORI MUNKA SORÁN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Cikkek

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

Előadások

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

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

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

Poszterek

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

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

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

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

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

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

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

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

