

ZÁRÓJELENTÉS

A kutatási projekt keretében tervezett feladatokat apró módosításoktól eltekintve a szerződésben lefektetetteknek megfelelően sikerült teljesíteni. A módosítások abból adódtak, hogy néhány előre nem látható fejlemény miatt a tervezetthez képest többletnek tekinthető munkát is elvégeztünk.

Az eredményeket az alábbiakban lehet összefoglalni:

1. A 2007-re tervezett feladatnak megfelelően sikerült identifikálni azokat a géneket a *Schizosaccharomyces pombe* genomjában, amelyek aktivitása függ a *sep10* által kódolt Mediátor-komponens aktivitásától. Az identifikálás érdekében a teljes genomot reprezentáló DNS-microarrayekre épülő transzkripciós profájling-ot hajtottunk végre a vad típusú sejtekből és a *sep10*- mutáns sejtekből izolált mRNS preparátumok felhasználásával.
2. A 2008-ra tervezetteknek megfelelően a mikroarray-eredményeket validáltuk molekuláris és fiziológiai módszerekkel. A hibridizációval kimutatott transzkripciószintváltozások megbízhatóságának tesztelésére négy gént/ORF-et választottunk ki. A SPBC1271.07c és SPAC14C4.09 géneket azért választottuk ki, mert jelentősen lecsökkent az aktivitásuk a *sep10*- mutánsban. Az előbbi N-acetyl-transferázt, az utóbbi pedig az Agn1 endo-alpha-glukanázt kódolja, amiről korábban kimutattuk, hogy részt vesz a citokinezisben. A másik kiválasztott génpár olyan volt, amelyek aktivitása megnőtt a *sep10*- sejtekben. Az előző egy árva szekvencia, az utóbbi pedig egy trofomyozin típusú fehérjét kódol. Az RT-PCR kísérletek megerősítették a mikroarray eredményeket.
3. A 2008-ra előírt fiziológiai validáláshoz azt a megfigyelést használtuk ki, hogy a *sep10*- sejtekben módosult aktivitású gének között nagy számban fordultak elő olyanok, amelyek MFS transzportereket illetve más, a stresszválaszokban részt vevő fehérjéket kódoltak. Fiziológiai tesztekkel sikerült bizonyítanunk, hogy a mutánsok, a csökkent aktivitású géneknek megfelelően, fokozott érzékenységet mutattak formamiddal, koffeinnel, Na₂SO₄-gyel, CaCl₂-dal, CdSO₄-gyel, valamint nitrogén- és glukóz-éhezéssel szemben.

4. A 2009-re tervezett program értelmében elvégeztük a transzkripciós profiling segítségével identifikált gének funkcióinak keresését. Mivel a *Sch. pombe* genom szekvenciájának annotálása előrehaladott állapotban volt, lehetőség nyílt az identifikált gének és ORF-ek funkcióinak kigyűjtésére a Sanger Institute (Cambridge) gondozásában működtetett adatbázisból. Három kategóriát találtunk: (i) ismert gének, (ii) gének, amelyekről még nincsenek adatok, de hasonlóságot mutatnak más fajok génjeihez és (iii) fajspecifikus gének, amelyek semmilyen más faj génjével sem mutatnak hasonlóságot. A Sep10-függő gének között nem találtuk meg a citokinezis két kulcsregulátorát kódoló gént, a *sep1*-et és az *ace2*-t. Ebből arra következtettünk, hogy a Sep10 fehérje nem rajtuk keresztül vesz részt a sejtszeparáció szabályozásában. Valószínűleg az általuk kódolt transzkripciós faktorokkal együttműködve, azaz koregulátorként működik.

5. A 2009-re tervezett programban előírtak szerint újabb citokinezis géneket is identifikáltunk, illetve már ismertekkel kapcsolatban sikerült új eredményeket elérnünk. Kimutattuk, hogy a *sep9* gén terméke a SAGA komplex részeként hatással van a sejtszeparáció szabályozására. A SAGA-ról eddig semmit sem lehetett tudni a *Schizosaccharomyces*-ben, de nyilván itt is a chromatin átszervezésében játszik szerepet, ami szükséges a gének transzkripciójához. A Sep10-től eltérően a Sep9 az *ace2* gén szabályozásán keresztül fejt ki a hatását. De nem sejtszeparációra specifikus, mert eredményeink szerint a vegetatív szaporodás és az ivari differenciálódás közötti átkapcsolásokhoz is szükséges. A másik, részletesebben jellemzett gén az *spl1* volt. Meglepő módon erről az derült ki, hogy egy tRNS-t kódol és esszenciális a sejt élete szempontjából. Viszont ha lecsökkentjük az aktivitását, akkor a sejt nem pusztul el, hanem több más defektus mellett nem hajtra végre a sejtszeparációt sem.

6. A 2010 évre tervezett feladat a pályázat benyújtásakor még volt egyértelműen definiálható. Időközben kiderült a microarray adatokból, hogy a *sep10* inaktiválása nem befolyásolja a *sep1* és az általa regulált *ace2* működését. Tehát egyik gén sem tartozik a Sep10-függő gének közé. Vagyis nincs értelme annak, hogy vizsgáljuk a Sep10 fehérje és ezen két gén promoterei közötti esetleges fizikai kapcsolódást. Mivel ezzel a lehetőséggel már korábban is számoltunk, a pályázati tervtől kicsit eltérve, az ott megfogalmazottakon túlmenően, több figyelmet szenteltünk a *sep9* génnek. Kiderítettük, hogy a *sep9* mutáns sejtekben lecsökken a citokinezis-gének transzkripciós aktivitása, beleértve az *ace2*-ét is, de az utóbbié kisebb mértékben. Viszont nem változik a *sep1* aktivitása. Tehát a *sep9* gén által kódolt fehérje két szinten szól bele a citokinezis szabályozásába: (1) közvetlenül a citokinezis géneknél az Ace2-

vel együttműködve, valamint (2) közvetve az *ace2* szabályozásán keresztül a Sep1-gyel együttműködve.

7. Kicsit váratlan eredményként, nemzetközi együttműködés keretében, észrevettük, hogy a Kin1 kináz is hozzájárul (áttételesen) a citokinezis normális befejezéséhez, a sejtszeparációhoz.

8. Szintén a tervezettek felül elkezdtük vizsgálni, hogy a fentiekben említett regulátorok és citokinezisgének milyen mértékben konzerváltak. Nagyszámú gombafajból származó szekvenciák bioinformatikai elemzése azt sugallja, hogy a *Schizosaccharomyces* fajok nagyon egyedi fehérjestruktúrákkal rendelkeznek. A szekvenciákból generált törzsfákon a *Schizosaccharomycesek* bazális, azaz ősi eredetű ágat képeztek. Az egyes fajok génjei legalább részben képesek egymást helyettesíteni. A *Saccharomycesek* fehérjéi a törzsfákon nagy távolságban helyezkedtek el tőlük és a megfelelő génjeik nem is voltak képesek komplementálni a *Schizosaccharomycesek* mutációit.

A fenti eredményekről a következő folyóiratközleményekben számoltunk be:

Miklos, I., Szilagyi, Z., Watt, S., Batta, G., Antunovics, Z., Enczi, K., Bahler, J., Sipiczki, M.:

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**:225-238, 2008

Miklos, I., Ludanyi, K., Sipiczki, M.: The pleiotropic cell separation mutation *spl1-1* is a nucleotide substitution in the internal promoter of the proline tRNA^{CGG} gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet*. **55**:511-520, 2009

Mehta, S., Miklos, I., Sipiczki, M., Sengupta, S., Sharma, N.: The Med8 mediator subunit interacts with the Rpb4 subunit of RNA polymerase II and Ace2 transcription activator in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters* **583**:3115-3120, 2009

Batta, G., Szilagyi, Z., Laczik, M., Sipiczki, M.: The involvement of the *Schizosaccharomyces pombe sep9/spt8*⁺ gene in the regulation of septum cleavage. *FEMS Yeast Res*. **9**:757-767, 2009

Cadou, A., Couturier, A., Le Goff, C., Soto, T., Miklos, I., Sipiczki, M., Xie, L., Paulson, J. R., Cansado, J., Le Goff, X.: Fission yeast Kin1 is a plasma membrane-associated kinase which regulates the cell surface. *Mol. Microbiol*. **77**:1186-1202, 2010.

Balazs, A., Batta, G., Miklos, I., Acs-Szabo, L., Vazquez de Aldana, C.R.,
Sipiczki, M.: Conserved regulators of the cell separation process in
Schizosaccharomyces. Fungal Genet. Biol. (in press), 2012