

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei
Thesis of PhD dissertation

A *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE SEP9⁺*
GÉNJÉNEK FUNKCIONÁLIS ANALÍZISE

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE *SEP9⁺* GENE IN
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

Batta Gyula

Témavezető/Supervisor: Dr. Sipiczki Mátyás



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2010.

1. Bevezetés

A mitotikus sejtciklus megértése nagy jelentőségű, különösképpen a rákos megbetegedésekkel kapcsolatos összefüggései miatt. Az 1970-es évektől számos új ismeretet sikerült felderíteni a sejtciklusról és annak szabályozásáról, többnyire olyan modellorganizmusok segítségével, mint a *Schizosaccharomyces pombe* vagy a *Saccharomyces cerevisiae*. Elsősorban a G1/S és G2/M szabályozási pontokat vizsgálták részletesen. Ismert, hogy az M fázis utolsó lépése során az utódsejtek szétválnak, amit citokinezisnek neveznek, azonban ez még egy kevésbé ismert folyamat.

Az 1990-es évek során tanszékünkön számos, a citokinezisben sérült mutánt izoláltak. E mutánsok között voltak olyanok, amelyek a vad típusú egysejtű megjelenés helyett többsejtűvé váltak, ami a szeptumhasítás elmaradásának tulajdonítható (lásd Sipiczki 2007-ben megjelent áttekintő közleményét). Ezeket „*sep*” (szeparációs) mutánsoknak nevezték el. Felismerték azt is, hogy e mutánsok többsége az ivari differenciálódásban és a stresszválaszban is sérült (Grallert és mtsi, 1999; Szilágyi és mtsi, 2002). A mutációt szenvedett gének azonosítása és elemzése során kiderült, hogy azok transzkripciós faktorokat kódolnak (lásd Sipiczki 2007-ben megjelent áttekintő közleményét).

A *sep1*⁺ gén egy fork-head típusú transzkripciós faktort kódol (Ribár és mtsi, 1997), ami a G2/M szabályozásban is rendkívül fontos Fkh2-vel együttműködve vesz részt a sejtseparáció szabályozásában (Buck és mtsi, 2004; Petit és mtsi, 2005; Szilágyi és mtsi, 2005). A *sep10*⁺, *sep11*⁺ és *sep15*⁺ gének a *S. cerevisiae* *MED31*, *MED18* és *MED8* génjeivel homológok, fehérjetermékeik pedig a Mediátor komplex alegységei (Zilahi és mtsi, 2000; Szilágyi és mtsi, 2002; Miklós és mtsi, 2008). E komplexnek nagy szerepe van a szabályozott transzkripcióban, mivel kapcsolatot teremt az aktivátorok, az általános transzkripciós faktorok és az RNS polimeráz II

között (a Mediátor komplexről bővebben lásd Casamassimi és Napoli 2007-es áttekintő cikkét).

A Sep9 valószínűleg szintén transzkripciós faktor, melyet a *S. cerevisiae* Spt8 fehérjével mutatott nagyfokú hasonlósága is alátámaszt. Az Spt8 a transzkripciót szabályzó SAGA komplex egyik alegysége (Eisenman és mtsi, 1994). A *S. cerevisiae* SAGA-ja a gének mintegy 10%-ának aktiválásában vesz részt, elsősorban a hisztonok acetilációjával (Grant és mtsi, 1997). Ezzel a promóter és aktivátor szekvenciák hozzáférhetővé válnak a transzkripciós gépezet számára (a SAGA komplexről bővebben lásd: Baker és Grant, 2007; illetve Daniel és Grant, 2007)

A doktori munka során a *Sch. pombe sep9⁺* génjét és a *sep9⁻* mutáns fenotípus molekuláris hátterét vizsgáltuk meg.

2. Módszerek

A vizsgálatokhoz felhasznált törzsek listája az 1. táblázatban található. A hasadóélesztő törzseket YEA (Sipiczki és Ferenczy, 1977) komplett táptalajon tartottuk fenn. Az auxotrófián alapuló szelekciókat vagy SMA (Sipiczki és Ferenczy, 1977) vagy pedig EMMA (Mitchison, 1970) minimál táptalajon végeztük. A spóráztatáshoz MSA-t (Egel és mtsi, 1994) használtunk, melyet szükség esetén nukleotid vagy aminosav kiegészítővel láttunk el, 50-75 µg/ml mennyiségben. Az „*nmt*” alapú expressziós kísérletekben 50µg tiamint adtunk 1ml tápközeghez. A baktériumokat LB tápközegben növesztettük, amit ampicillinnel egészítettünk ki (50 µg/ml).

Növekedési tesztet mind YEA csészén, mind YEL (Sipiczki és Ferenczy, 1977) tápfolyadékban végeztünk. A vizsgált törzseket különböző hígításokban kicseppentettük YEA-ra, majd négy napig inkubáltunk 25°C, 30°C és 37°C hőmérsékleteken. Az YEL-ben történő növekedést 25°C és 30°C-on vizsgáltuk óránként mérve az optikai denzitást (590 nm-en).

A klasszikus genetikai és mikrobiológiai kísérleteket, mint például a keresztezés és tetrádanalízis, Gutz és mtsi (1974), valamint Alfa és mtsi (1993) által közöltek szerint végeztük. A rekombináns kettős mutánsok előállítása steril mutánsokból a szomatikus sejt hibridizáció módszerével történt (Sipiczki és Ferenczy, 1977).

Az olyan alkalmazott alapvető molekuláris biológia módszereket, mint például a genomiális és plazmid DNS izolálása, a *Sch. pombe* sejtek plazmiddal való transzformálása, vagy a baktériumok transzformálása, Sambrook és mtsi (1989), illetve Moreno és mtsi (1991) leírásai alapján végeztük. A PCR amplikonokkal történő transzformálások Keeney és Boeke (1994) módszere szerint történt. RNS-t a génexpressziós vizsgálatokhoz Chomczynski és Sacchi (1987) módszere alapján izoláltuk. A restrikciós emésztéseket és ligálásokat a gyártók leírásai alapján végeztük. A DNS és

RNS mintákat gélelektroforézissel ellenőriztük (120 V, 1%-os agaróz gél, 1x TBE puffer), valamint a szükséges koncentrációméréseket Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer készülékkel végeztük.

PCR reakciókat hajtottunk végre annak érdekében, hogy a *sep9-307* törzsben a mutációt megtaláljuk, és a lehetséges intronok helyzetét meghatározzuk. A *sep9A* törzs előállításához szükséges amplikonok felszaporítása Bähler és mtsi (1998) által leírtak szerint történt. A *Sch. japonicus*-ban található feltételezett *Sch. pombe sep9⁺* ortológot is amplifikáltuk későbbi a klónozás és expresszió érdekében. Minden PCR reakcióhoz a paramétereket a primerek olvadási hőmérsékletének és a termék nagyságának megfelelően állítottuk be. Az amplifikációk vagy MJ Research Minicycler PTC150, illetve ABI 2720 Thermalcycler géppel történtek.

Valamennyi szekvenálást a Geneart AG cég végezte el.

A kvantitatív real-time PCR-hez használt cDNS előállításához szükséges reverz-transzkripció a gyártó javaslatai alapján történt. Az ezt követő qPCR reakciókat Bio-Rad iQ5 készülékkel végeztük és Bio-Rad SYBR Green Supermix reagenst használtunk, a kapott adatokat pedig a Bio-Rad iQ5 Optical System 2.0 verziójú szoftverrel dolgoztuk fel.

A primerek szekvenciáját a 2. táblázat tartalmazza.

A mikroszkópos felvételeket az Olympus BH-2 és DX-40 mikroszkópokkal és az Olympus DP-70 kamerával készítettük, míg a képeket a mellékelt szoftverrel dolgoztuk fel.

A mikofenolsavas (MPA, egy transzkripció elongáció inhibitor) stressztesztet Desmoucelles és mtsi (2002) által leírt módszer szerint végeztük. A különböző mutáns törzsek sejtjeit különböző MPA koncentrációt (0; 0,02; 0,1 és 0,2 µg/µl) tartalmazó YEA csészékre tettük ki,

majd 4 napos 30°C-on történő inkubáció után vizsgáltuk a képződő telepeket. Így meghatároztuk, hogy mely mutánsok érzékenyek.

A bioinformatikai vizsgálatokat a következő adatbázisok felhasználásával végeztük: Sanger Institute (<http://www.genedb.org>) és Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu>). A páronkénti illesztéseket a NCBI Blast2 algoritmusával készítettük (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). A többszörös illesztések a Clustal 1.8 szoftverrel készültek (Thompson és mtsi, 1994), míg a családfákat a Phylip 3.54 programcsomaggal állítottuk elő (Felsenstein, 2001). A családfákat a TreeView programmal tettük láthatóvá (Page, 1996).

1. táblázat. Törzsek.

Törzs	Genotípus
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
0-1	Vad típus L972 h ⁻
0-2	Vad típus L968 h ⁹⁰
0-39	<i>leu1-32</i> h ⁻
0-369	<i>ura4- D18</i> h ⁹⁰
2-1310	<i>ura4- D18 leu1-32</i> h ⁹⁰
2-1043	<i>Aace2::kanMX4 ura4-D18</i> h ⁻
2-1042	<i>Aace2::kanMX4 ura4-D18 leu1-32</i> h ⁻
2-683	<i>sep9-307 ade3-58</i> h ⁹⁰
2-521	<i>sep9-307 ura4-D18</i> h ⁹⁰
2-692	<i>sep9-307 ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰
2-1053	<i>Asep9::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰
2-1309	<i>Asep9::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰
2-1314	<i>sep9-307 Asep10::ura4⁺ leu1-32 ade6-M26</i> h ⁹⁰
2-989	<i>Asep10::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰
2-922	<i>Asep10::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M26</i> h ⁹⁰
2-898	<i>Asep11::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰
2-896	<i>Asep11::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰
2-991	<i>sep15-598</i> h ⁹⁰
2-870	<i>sep15-598 his3</i> h ⁹⁰
2-1300	<i>Aste11::ura4⁺ leu1-32</i> h ⁹⁰
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	
7-1	Vad típus (CCY 44-5-1=CBS 354)
<i>Escherichia coli</i>	
DH5	<i>DH5 F (ø80dΔ(lacZ)M15) recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>

2. táblázat. Primerek.

Primer neve	Primer szekvencia
sep9KOFW	5'- GGA ACG TAA ACA AAA CAT ATT GTT GCT GCA TTG CAG CAT TTT AAG GTT ACA ACT CTT TTT GTG TAT ATT TTA AAG CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'
sep9KORW	5'- AAT CGT AAC CCA CTT CCT TTC AGT CTA TTA TCA TAA TGT ACA TTA TTG CGA ATA TGT GTT TTA GAG AAA GCA TTA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GA -3'
s9s1.2forw	5'- CCT TGT CAA ACT TCC CCA TTC -3'
KOura	5'- GCT ACA ATA TGC ATC TGG -3'
s9forw1.1	5'- GCT GCA TTG CAG CAT TTT AAG -3'
s9rev1	5'- GAA CCC AAA GAC CTC TGG -3'
s9forw2	5'- TCT CTC CCT GAC TGT TGC -3'
s9rev2	5'- CCC ATA CAT TCA TAA CTC C -3'
s9forw3	5'- TCT GTT CAA GCA AAT GAG GAG -3'
s9rev3	5'- CGT AAC CCA CTT CCT TTC -3'
s9oeforw	5'- CAT ATG GAA GCA GAA GAG AGT GAG TCC -3'
s9oerev	5'- GGA TCC CGA ATA TGT GTT TTA GAG AAA GC -3'
sce3RTs	5'- GTG ACT GGG TTC GTC GTG -3'
sce3RTa	5'- GGC GCT CAG AGG ATT CAC -3'
ace2RTleft	5'- TAA CAA TGA CGC ATT TTC CTT G -3'
ace2RTright	5'- TGT TGT TGA GAG TCC AGC TCA T -3'
adg1_273-293F	5'- CCC AAC TAG CGC TAC TAC GAC -3'
adg1_356-375R	5'- AGT GTC CAC TGG CGG ATT AC -3'
eng_1 1765-1784F	5' GGC GAT TCT GAT ATG GAG GA -3'
eng_1 1851-1870R	5'-TAG AAG TGG GCT GGA CGT TT -3'
ste11RTleft	5'- TGT CAG CCG ATA AAG TGT TGT C -3'
ste11RTright	5'- GGT ATT CGG GGT TTT AGG TGA T -3'
Sj.sep9s	5'- TAC GTA GTC ATA TGG ATG AGT CTG AAG TGG AAT TAG -3'
Sj.sep9aBamHI	5'- TAC GTA GTG GAT CCT TAC GGG TTA GAA TTA ATA ACG -3'
Sj.sep9in	5'- ATC CCA TAA ATG CAC ATC ACG -3'
Prep41sense	5'- GTC ATT CGG CAA TGT GCA GC -3'
Sjs9RTs	5'- CCG TCT CTA ACG ATG AAA ACA CAC C -3'
Sjs9RTa	5'- ATT TGG TTG CCG TTG GTC CC -3'

3. Új tudományos eredmények

Először a *sep9-307* mutáns törzsben PCR és szekvenálás segítségével azonosítottunk egy pontmutációt. Ez a pontmutáció kereteltolódáshoz vezet, mely egy csonka Sep9 fehérjét eredményez egy stop jelnek köszönhetően a 353. aminosav helyén. A szekvenálással egy intront sikerült azonosítani a *sep9⁺* génben. Az intron azonban nem az adatbázisban leírtaknak megfelelő pozícióban (56. és 102. bázispár között) helyezkedik el, hanem az 57. és a 103. bázispár között. Így az intron ugyanakkora méretű és aminosav sorrend eltérést sem eredményez.

A *sep9Δ* mutáns törzsek előállításához PCR segítségével (*sep9KOFW* és *sep9KORW* primereket használva) deléciós konstrukciót hoztunk létre, majd az amplikonnal transzformáltunk. E deléciós mutáns sejtek majdnem teljesen úgy viselkedtek, mint a *sep9-307* törzs sejtjei. Szeparációs zavar, lassú növekedés és az ivari differenciálódás sérülése jellemezte azokat. Ugyanakkor – szemben a pontmutánssal - hőmérsékletérzékenységet is mutattak 37°C-on, szemben a pontmutánssal. Valamennyi mutáns tenyészetben a sejtek többsége „*sep*” fenotípust mutatott, azonban vad típusúak is megfigyelhetők voltak. Ez azt jelenti, hogy bár a Sep9 egy fontos regulátor, nem létfontosságú a sejt számára, szokásos növekedési körülmények között. Azt is megfigyeltük, hogy az MPA transzkripciós elongációs gátlószerezrel szemben nem mutatnak nagyobb érzékenységet a *sep9⁺* sejtek, mint a vad típusú sejtek. Ez az eredmény meglepő, tekintve, hogy a *S. cerevisiae SPT8⁻* sejtek érzékenyek. További vizsgálatokat szükségesek a nem várt eredmények értelmezéséhez.

A korábbi bioinformatikai vizsgálatok alapján - miszerint a *S. cerevisiae Spt8* és *Sch. pombe Sep9* fehérjék nagyfokú hasonlóságot mutatnak – valamint, hogy a *sep9⁺* mutánsban több egymástól független folyamat is sérült, azt feltételeztük, hogy a Sep9 is egy transzkripciós faktor. Elméletünk

bizonyítására qPCR-rel géneexpressziós vizsgálatokat hajtottunk végre (primerpárok: *sce3RTs-sce3RTa*, *ace2RTleft-ace2RTright*, *adg1_356-375F-adg1_356-375R*, *eng_1 1851-1870F-eng_1 1851-1870R* és *ste11RTleft-ste11RTright*).

A kísérletek során azt találtuk, hogy a sejtszeparáció kulcsmolekuláját kódoló *ace2⁺* génnek a transzkripciója jelentősen csökkent a vad típushoz képest a *sep9⁻* mutánsban. Hasonlót figyeltünk meg két vizsgált *ace2⁺* célgén (*adg1⁺* és *eng1⁺*) esetében is, azonban az *eng1⁺* nagyobb mértékű esést mutatott. Továbbá az Ace2-t túltermeltettük a *sep9⁻* sejtekben, melynek eredményeként majdnem tökéletesen visszaállt a vad típusú sejt morfológia. Ezek a kísérletek azt bizonyítják, hogy a Sep9 egyértelműen szerepet játszik a sejtosztódás szabályozásában, de hogy ez közvetlen és/vagy közvetett szabályozást jelent-e, azt egyelőre nem tudtuk megállapítani.

Mivel a *sep9⁻* sejtek az ivari folyamataikban is sérültek, ezért megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a *sep9⁻* mutációs háttér az *aff1/ste11⁺* központi regulátor kódoló gén (Sipiczki, 1988; Sugimoto és mtsi, 1991) expressziójára. Eredményeink azt mutatták, hogy az *aff1/ste11⁺* szint jelentősen csökkent a vad típusú sejtekéhez képest. Ezen felül az Aff1/Ste11-et is túltermeltettük, melynek során csak részlegesen állt vissza a konjugációs és aszkuszképzési képesség. Így valószínűsíthető, a hogy *Sch. pombe* ivari differenciálódásában a Sep9 más gének transzkripciójára is hatással van, nem csak az *aff1/ste11⁺*-re.

Kísérleteink alapján tehát valószínűsíthető, hogy a Sep9 valóban transzkripciós faktor, amely részt vesz mind a sejtszeparáció, mind pedig az ivari folyamatok szabályozásában is.

Egy korábbi tanulmányban kimutattuk, hogy a *sep10/med31⁺* és a *sep15/med8⁺* gének Mediátor alegységeket kódolnak, és részt vesznek az *ace2⁺* átírásának szabályozásában (Miklós és mtsi, 2008). Ugyanakkor az is

bebizonyosodott, hogy a Sep10/Med31 és Sep11/Med18 az *aff1/ste11*⁺ átírását is szabályozzák (Szilágyi és mtsi, 2002). Összevetve e tényeket és a fenti megállapításokat, elmondhatjuk, hogy mind a SAGA, mind a Mediátor komplex szükséges az *ace2*⁺ és az *aff1/ste11*⁺ normális szintű átírásához. Továbbá sikerült kimutatni azt is, hogy a *sep10⁻ sep11⁻* és a *sep11⁻ sep15⁻* mutációpárok letálisak (Miklós és mtsi, 2008). E doktori tanulmány során *sep9⁻ sep10⁻*, *sep9⁻ sep11⁻* és *sep9⁻ sep15⁻* kettős mutánsokat is próbáltunk előállítani szomatikus sejthibridizációval. Ezek közül azonban csak a *sep9⁻ sep10⁻* kettős mutáns bizonyult életképesnek. Mindent összevetve azt mondhatjuk, hogy ezek nem csak az *ace2*⁺ vagy az *aff1/ste11*⁺ gének, de más gének transzkripciójában is együttműködnek. Ráadásul, ha mindkét komplexet elrontjuk, akkor vagy az egyes létfontosságú gének átírási szintje csökken le oly mértékben, hogy az már a sejtek pusztulásához vezet, vagy pedig olyan sok gén expressziója esik le, hogy az lesz végzetes a sejt számára. E kísérletes adataink teljesen egybevágnak a szakirodalommal. Például a *S. cerevisiae*-ben hasonló eredményeket kaptak miután különböző Mediátor és SAGA alegység mutációkat kombináltak (Roberts és Winston, 1997; Larschan és Winston, 2005).

Végül megvizsgáltuk bioinformatikai eszközökkel a *Sch. pombe* Sep9 fehérje rokoni kapcsolatát más fajokban található feltételezett ortológjaival, valamint interspecifikus komplementációs kísérletet is végrehajtottunk. A különböző fajok szekvenciáinak vizsgálata során többek közt a következő fajokban találtunk feltételezett ortológokat: a *S. cerevisiae*-ben az *SPT8*-at, az *Aspergillus niger*-ben az An07g04000-t, *Coccidioides immitis*-ben a CIMG_06699-et, a *Yarrowia lipolytica*-ban az YALI0E23804p-t, azonban ezek hasonlósága a Sep9-hez változó volt. Amint az várható volt, a legnagyobb mértékű hasonlóságokat a *Schizosaccharomyces* csoporton belül találtuk. A *Sch. octosporus* SOCG_02609.2 73%-os, míg a *Sch. japonicus*

SJAG_02066.2 61%-os szekvencia-azonosságot mutatott a *Sch. pombe* Sep9 fehérjével. Sikerült azt is kimutatni, hogy a *S. cerevisiae* Spt8-a nem tudja a sep9⁻ fenotípust kijavítani vad típusra (Batta és mtsi, 2009). Továbbá a doktori munka során a *Sch. japonicus* SJAG_02066.2 termeltetése sem komplementálta a *Sch. pombe* sep9⁻ fenotípust (klónozó primerpár: Sj.sep9s és Sj.sep9aBamHI). Ez valószínűleg az igen savas N-terminális szakaszok nagyfokú változatosságának köszönhető, mely fajra specifikus, mind az aminosavsorrendet, mind pedig a hosszt tekintve. Ezek a rendkívül változékony fehérjeszakaszok a különböző fajok sejtjein belüli, feltehetően az eltérő körülményekhez történő jobb idomulást biztosítják.

4. Összefoglalás

A citokinezist az elmúlt 15 évben igen behatóan tanulmányozták a Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén. Modellszervezetként a *Sch. pombe* került használatba, tekintve, hogy számos olyan tulajdonságot hordoz, mely nagyfokú hasonlóságot mutat emlőssejtekkel. Az 1990-es évek elején számos citokinezisben sérült mutáns izoláltak. Ezek egy része a vad típusú egysejtű morfológiával szemben többsejtűvé vált, mivel a szeptumhasításuk elmaradt. Ezeket a mutánsokat „sep” (szeparációs) mutánsoknak nevezték el. A mutánsok vizsgálata során felismerték, hogy e mutánsok többsége nem csak a sejtciklusban, de az ivari folyamatában és a stresszválaszban is sérült. A *sep1⁺*-ről kiderült, hogy egy fork-head típusú DNS kötő transzkripciósfaktort kódol, mely fontos szereppel bír a citokinezis szabályozásában. A *sep10⁺*, *sep11⁺* és *sep15⁺* pedig a *S. cerevisiae* Mediátor alegységeket kódoló *MED31*, *MED18* és *MED8* génekkel homológok.

Jelen Ph.D. disszertációban a *Sch. pombe sep9⁺* gén szerepének vizsgálatát és a *sep9⁻* fenotípus hátterének feltárását tűztük ki célul. A *sep9⁺* feltehetően egy SAGA alegységet kódol. Ezt a Sep9 fehérje és a *S. cerevisiae* Spt8 protein közötti nagyfokú hasonlóság támasztja alá, hiszen az Spt8 bizonyítottan SAGA alegység. További vizsgálatok kimutatták, hogy bár a két fehérje 31%-ban azonos, az Spt8 nem képes visszaállítani a vad fenotípust a *sep9⁻* mutánsokban történő termelése során. További kísérletünk során az is bebizonyosodott, hogy még egy közelebbi rokon, a *Sch. japonicus* feltételezett Sep9 homológja sem állítja vissza a vad fenotípust a *Sch. pombe sep9⁻* mutánsban.

A *sep9⁻* mutáns sejtek fő jellegzetességei a hifás növekedés, valamint az ivari differenciálódás elmaradása. A *sep9⁺* gén teljes eltávolítása életképes sejteket eredményezett, ami azt jelenti, hogy a gén nem létfontosságú. A

sep9Δ sejtek fenotípusa szinte teljesen megegyezik a *sep9-307* pontmutánsával, a sejtek azonban lassabban szaporodnak és 37°C-on el is pusztulnak. A *sep9⁻* mutáns sejtek a transzkripció elongációját gátló mikofenolsavra ugyanolyan mértékű érzékenységet mutatnak, mint a vad típusú sejtek.

Génexpressziós kísérleteinkben azt találtuk, hogy az *ace2⁺*, ami a citokinezis utolsó lépésének központi szabályozója, átírásának szintje jelentősen lecsökken. Továbbá a vizsgált Ace2 célgénjei is alacsony profilú expressziót mutatnak, sőt ezek közül az *eng1⁺* igen jelentős csökkenést produkált. Elképzelhető, hogy már az *ace2⁺* átírás csökkenés elegendő ahhoz, hogy a részleges szeparációs defektus megjelenjen a *sep9⁻* mutáns tenyészetekben. Ugyanakkor a Sep9 közvetlen hatása sem zárható ki e célgénekre. Ennek ellentmond viszont az a megfigyelésünk, hogy az Ace2 túltermeltetése a *sep9⁻* sejtekben szinte tökéletesen visszaállítja a vad fenotípust.

A *sep9⁻* mutációs háttérben az ivari differenciálódást szabályzó központi regulátort kódoló *aff1/stell⁺* transzkripciós szintje is lecsökkent. Ugyanakkor az Aff1/Stell plazmidról történő túltermelése nem tudta teljes mértékben visszaállítani a vad fenotípust, amiből arra következtethetünk, hogy további szabályzó fehérjék kifejeződése is befolyásolt.

Mivel a korábbi eredmények azt mutatták, hogy bizonyos Mediátor alegységek inaktivációja is szeparációs problémákat eredményez, így megvizsgáltuk különböző mutációk kombinációinak hatását a sejtekre. Ennek érdekében szomatikus sejhibridizációval és rekombinációval kettős mutánsokat állítottunk elő. A tetrádanalízis során azt tapasztaltuk, hogy csak a *sep9⁻ sep10⁻* kettős mutánsok életképesek, míg sem *sep9⁻ sep11⁻*, sem pedig *sep9⁻ sep15⁻* dupla mutánst nem sikerült izolálnunk. Feltevésünk szerint a

SAGA és a Mediátor komplex együttes elrontása annyi gén transzkripcióját érinti, amit már a sejtek nem képesek elviselni és ezért elpusztulnak.

Ezekből a kísérletekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a *sep9*⁺ egy transzkripciós faktort kódol, melynek kulcsfontosságú szerepe van a citokinezis és az ivari ciklus folyamatában is. A sérült vagy hiányzó Sep9 számos defektust eredményez, azonban ezek egyike sem halálos a sejtre nézve. Eredményeink alapján a Sep9, Sep10/Med31, Sep11/Med18 és Sep15/Med8 fehérjék mind hatással vannak a sejtseparációs génekre, de ugyanakkor további, más folyamatokat érintő gének szabályozásában is szerepet játszhatnak.

Azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy a Sep9 pontos szerepét felderítsük a citokinezisben és az ivari differenciálódásban. Például azáltal, hogy más célgéneket azonosítunk qPCR vagy lehetőség szerint DNS chip segítségével. Egyéb, eddig nem vizsgált „*sep*” gének jellemzése, valamint a különböző Sep fehérjék közötti esetleges biokémiai kölcsönhatások tanulmányozása szintén hozzájárulhat e bonyolult szabályozási hálózatok megismeréséhez.

1. Introduction

Understanding the process of mitotic cell division cycle is of great importance, especially due to its connection to malignant diseases. Since the 1970s much new information have been obtained about the cell cycle and its regulation, mainly from model organisms, such as *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. Especially G1/S and G2/M checkpoints have been examined in details. A less studied cell cycle event is cytokinesis, the final step of the M phase, when the daughter cells become separated.

In the 1990s several *Sch. pombe* cytokinesis mutants have been isolated at our department. Among some of the mutants the original unicellular phenotype became multicellular since the septa in between the cells were not dissolved (for review see Sipiczki, 2007). They were designated „*sep*” (separation) mutants. It was also found that most of these mutants are also affected in their sexual differentiation and stress response (Grallert *et al.*, 1999; Szilágyi *et al.*, 2002). After the identification and analysis of the genes that suffered these mutations, it was found that these genes code for transcription factors (for review see Sipiczki, 2007).

Sep1⁺ gene encodes a fork-head type DNA binding transcription factor (Ribár *et al.*, 1997), that plays an important role in the regulation of cell separation collaborating with Fkh2, which is also a G2/M regulator (Buck *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 2005; Szilágyi *et al.*, 2005). *Sep10*⁺, *sep11*⁺ and *sep15*⁺ are homologs of *S. cerevisiae* *MED31*, *MED18* and *MED8* genes, respectively, and their protein products are subunits of the Mediator complex (Zilahi *et al.*, 2000; Szilágyi *et al.*, 2002; Miklós *et al.*, 2008). This complex has an important role in the regulated transcription by creating a connection between activators, general transcription factors and the RNA polymerase II

enzyme (for general review on Mediator see Casamassimi and Napoli, 2007).

Sep9⁺ is also believed to encode a transcription factor, which is supported by the sequence similarity with the yeast *S. cerevisiae* Spt8 protein. Spt8 is a subunit of SAGA transcription regulating complex (Eisenman *et al.*, 1994;), which plays a role in the activation of about 10% of the yeast genes by performing histone acetylation (Grant *et al.*, 1997). This makes the promoter and activator regions available for the transcription machinery (for reviews on SAGA see Baker and Grant, 2007; Daniel and Grant, 2007).

In this PhD study we analysed the role of the *Sch. pombe sep9*⁺ gene and the molecular basis of the *sep9*⁻ phenotype.

2. Materials and methods

Strains used in our investigation are listed in Table 1. Fission yeast strains were maintained on complete medium YEA (Sipiczki and Ferenczy, 1977). For auxotrophic selection we used either SMA (Sipiczki and Ferenczy, 1977) or EMMA (Mitchison, 1970) minimal media and for sporulation tests MSA (Egel *et al.*, 1994) was applied. If necessary we added nucleotid and aminoacid supplements (50-75 µg/ml). For „*nmt*” based expression experiments 50 µg thiamnine was added to 1 ml minimal media. For bacteria we used LB, supplemented with ampicillin (50 µg for 1 ml).

Growth tests were carried out both on YEA and in YEL (Sipiczki and Ferenczy, 1977). On YEA each of the analysed strains was spotted in different dilutions on plate, and were incubated for 4 days at 25°C, 30°C and 37°C. In YEL, strains were incubated at 25°C and 30°C, and the optical density (at 590 nm) was measured every hour.

Classical genetic and microbial experiments, such as crossing of strains and tetrad analysis were carried out by the methods described by Gutz *et al.* (1974) and Alfa *et al.* (1993). In case of sterile strains somatic hybridization was performed to obtain recombinant double mutants (Sipiczki and Ferenczy, 1977).

Basic molecular methods were carried out on the basis of descriptions published by Sambrook *et al.* (1989) and Moreno *et al.* (1991), such as genomic DNA and plasmid DNA isolation, yeast transformation with plasmids and transformation of bacteria. Transformation of *Sch. pombe* with PCR fragments were carried out as published by Keeney and Boeke (1994). Total RNA for gene expression analysis was isolated as described by Chomczynski and Sacchi (1987). Restriction digestion and ligation were done as manufacturers suggested. DNA and RNA samples were analysed by gelelectrophoresis (120 V, 1%-os agarose gel, 1x TBE buffer), and if

necessary, concentrations were measured with Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

PCR reactions were carried out to identify the mutation in *sep9-307* mutant, and to detect the position of possible introns in *sep9⁺* gene. To create *sep9Δ* deletion mutant we used a PCR method developed by Bähler *et al.* (1998). Also the supposed ortholog of *Sch. pombe sep9⁺* in *Sch. japonicus* was amplified for cloning and expressing in *Sch. pombe* for interspecific complementation test. All PCR amplification parameters were adjusted to the oligos' melting temperature and amplicon size and MJ Research Minicycler PTC150 or ABI 2720 Thermalcycler machines were used. For primer sequences, see Table 2.

All sequencings were done by the Genearth AG company.

Reverse-transcription to create cDNA for quantitative real-time PCR was done as manufacturer's description suggested. The following qPCR reactions were carried out with Bio-Rad iQ5 machine and Bio-Rad SYBR Green Supermix reagent, data were analysed with Bio-Rad iQ5 Optical System 2.0 software.

Microscopy was done with Olympus BH-2 and DX-40, pictures were taken by Olympus DP-70 camera and were processed by its software.

Stress test with micophenolic acid (MPA, a transcription elongation inhibitor) was carried out by a method described by Desmoucelles *et al.* (2002). Cells of different mutant strains were spotted on YEA plates supplemented with different final concentrations of MPA in those (0; 0,02; 0,1 and 0,2 µg/µl). After 4 days of incubation at 30°C we were looking for colony formation to identify the sensitive mutants.

Bioinformatics were done with the use of databases found at these websites: Sanger Institute (<http://www.genedb.org>) and Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu>). Pairwise alignments were done with the NCBI

Blast2 algorithm at NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). Multiple alignments were obtained with Clustal 1.8 software (Thompson *et al.*, 1994), while dendograms were created with Phylip 3.54 software (Felsenstein, 2001). Dendograms were visualized with TreeView software (Page, 1996).

Table 1. Strains used.

Strain	Genotype
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
0-1	Wild type L972 h ⁻
0-2	Wild type L968 h ⁹⁰
0-39	<i>leu1-32</i> h ⁻
0-369	<i>ura4- D18</i> h ⁹⁰
2-1310	<i>ura4- D18 leu1-32</i> h ⁹⁰
2-1043	<i>Ace2::kanMX4 ura4-D18</i> h ⁻
2-1042	<i>Ace2::kanMX4 ura4-D18 leu1-32</i> h ⁻
2-683	<i>sep9-307 ade3-58</i> h ⁹⁰
2-521	<i>sep9-307 ura4-D18</i> h ⁹⁰
2-692	<i>sep9-307 ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰
2-1053	<i>Asep9::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰
2-1309	<i>Asep9::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰
2-1314	<i>sep9-307 Asep10::ura4⁺ leu1-32 ade6-M26</i> h ⁹⁰
2-989	<i>Asep10::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰
2-922	<i>Asep10::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32 ade6-M26</i> h ⁹⁰
2-898	<i>Asep11::ura4⁺ ura4-D18</i> h ⁹⁰
2-896	<i>Asep11::ura4⁺ ura4-D18 leu1-32</i> h ⁹⁰
2-991	<i>sep15-598</i> h ⁹⁰
2-870	<i>sep15-598 his3</i> h ⁹⁰
2-1300	<i>Aste11::ura4⁺ leu1-32</i> h ⁹⁰
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	
7-1	Wild type (CCY 44-5-1=CBS 354)
<i>Escherichia coli</i>	
DH5	<i>DH5 F (ø80dΔ(lacZ)M15) recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>

Table 2. Primers used.

Primer name	Primer sequence
sep9KOFW	5'- <i>GGA ACG TAA ACA AAA CAT ATT GTT GCT GCA TTG CAG CAT TTT AAG GTT ACA ACT CTT TTT GTG TAT ATT TTA AAG CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC</i> -3'
sep9KORW	5'- <i>AAT CGT AAC CCA CTT CCT TTC AGT CTA TTA TCA TAA TGT ACA TTA TTG CGA ATA TGT GTT TTA GAG AAA GCA TTA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GA</i> -3'
s9s1.2forw	5'- CCT TGT CAA ACT TCC CCA TTC -3'
KOura	5'- GCT ACA ATA TGC ATC TGG -3'
s9forw1.1	5'- GCT GCA TTG CAG CAT TTT AAG -3'
s9rev1	5'- GAA CCC AAA GAC CTC TGG -3'
s9forw2	5'- TCT CTC CCT GAC TGT TGC -3'
s9rev2	5'- CCC ATA CAT TCA TAA CTC C -3'
s9forw3	5'- TCT GTT CAA GCA AAT GAG GAG -3'
s9rev3	5'- CGT AAC CCA CTT CCT TTC -3'
s9oeforw	5'- CAT ATG GAA GCA GAA GAG AGT GAG TCC -3'
s9oerev	5'- GGA TCC CGA ATA TGT GTT TTA GAG AAA GC -3'
sce3RTs	5'- GTG ACT GGG TTC GTC GTG -3'
sce3RTa	5'- GGC GCT CAG AGG ATT CAC -3'
ace2RTleft	5'- TAA CAA TGA CGC ATT TTC CTT G -3'
ace2RTright	5'- TGT TGT TGA GAG TCC AGC TCA T -3'
adg1_273-293F	5'- CCC AAC TAG CGC TAC TAC GAC -3'
adg1_356-375R	5'- AGT GTC CAC TGG CGG ATT AC -3'
eng_1_1765-1784F	5' GGC GAT TCT GAT ATG GAG GA -3'
eng_1_1851-1870R	5'-TAG AAG TGG GCT GGA CGT TT -3'
ste11RTleft	5'- TGT CAG CCG ATA AAG TGT TGT C -3'
ste11RTright	5'- GGT ATT CGG GGT TTT AGG TGA T -3'
Sj.sep9s	5'- TAC GTA GTC ATA TGG ATG AGT CTG AAG TGG AAT TAG -3'
Sj.sep9aBamHI	5'- TAC GTA GTG GAT CCT TAC GGG TTA GAA TTA ATA ACG -3'
Sj.sep9in	5'- ATC CCA TAA ATG CAC ATC ACG -3'
Prep41sense	5'- GTC ATT CGG CAA TGT GCA GC -3'
Sjs9RTs	5'- CCG TCT CTA ACG ATG AAA ACA CAC C -3'
Sjs9RTa	5'- ATT TGG TTG CCG TTG GTC CC -3'

3. Results and discussion

First we identified a point mutation in the *sep9-307* mutant by PCR reactions (primerpairs: s9forw1.1-s9rev1, s9forw2-s9rev2 and s9forw3-s9rev3) and sequencing. The point mutation resulted in a frameshift which causes a truncated Sep9 protein, because of a stop at the 353. residue. With sequencing we also identified that the *sep9⁺* gene has one intron, but not in the position suggested by the database (from 56th to 102. base). We found that the intron ranges from the 57th position and lasts till the 103rd base. The length of the intron is the same, as indicated in the database, and this difference also results in the same aminoacid sequence in both cases.

In order to create a deletion mutant we used primers sep9KOFW and sep9KORW, and after transformation of the wild type with the amplicon, we successfully isolated two *sep9Δ* deletion mutant strains with different markers. These cells showed almost the same phenotype as the *sep9-307* mutant cells: separation defects, slow growth and impairment in sexual differentiation, however they were temperature sensitive at 37°C. Both in the deletion mutants and the point mutants, the majority of the cells showed hyphal growth, that is unusual in *Sch. pombe* wild type cells, and also some wild type cells could be observed in the cultures. Consequently, though Sep9 must be an important regulator, the cells can survive the deletion in normal environment. The *sep9⁺* cells do not show any different sensitivity to the transcription elongation inhibitor MPA compared to the wild type, however the *sep10⁻*, *sep11⁻* and *sep15⁻* Mediator mutants do. This result was somewhat unexpected as it was earlier shown by Desmoucelles *et al.* (2002) that in *S. cerevisiae* the *SPT8⁻* mutants are sensitive. Further investigation is needed to analyse this phenomenon.

From bioinformatic analysis (Sep9 is highly similar to the SAGA subunit Spt8 of the yeast *S. cerevisiae*) and the complex mutant phenotype (see

above) we presumed that the Sep9 protein is a transcription factor. To check this idea we carried out gene expression experiments with qPCR reactions (primerpairs: sce3RTs-sce3RTa, ace2RTleft-ace2RTright, *adg1_356-375F-adg1_356-375R*, *eng_1_1851-1870F-eng_1_1851-1870R* and *ste11RTleft-ste11RTright*).

We found that the transcription of *ace2*⁺, coding for a key regulator of cell separation (for review see Sipiczki, 2007) significantly dropped in our *sep9*⁻ mutants compared to wild type. The same reduction was observed in the case of two Ace2 targets: *eng1*⁺ and *adg1*⁺, although the *eng1*⁺ level was even lower. In addition we overexpressed *ace2*⁺ in *sep9*⁻ cells, and as a result wild type cell morphology was restored. These experiments suggest that Sep9 plays a role in the regulation of cell separation, although we can not tell whether it is direct or indirect.

Since the *sep9*⁻ mutants are also impaired in sexual differentiation, we analysed whether *sep9*⁻ mutations had an effect on the expression of the gene *aff1/ste11*⁺, that codes for a key regulator of the initiation of sexual differentiation (Sipiczki, 1988; Sugimoto *et al.*, 1991). Our results showed that *aff1/ste11*⁺ mRNA level in *sep9*⁻ mutants is very low compared to wild type cells. We also overexpressed *aff1/ste11*⁺ in *sep9*⁻ mutants, but the capability of conjugation and ascus formation was barely restored. This failure of full complementation could mean that there are other Sep9 dependent participants in the process of *Sch. pombe* sexual differentiation.

From these results we can conclude that Sep9 is indeed a transcription factor and it plays a role in the regulation of cell separation and sexual differentiation.

In an earlier study we showed that the *sep10/med31*⁺ and *sep15/med8*⁺ genes code for subunits of Mediator that play role in the regulation of *ace2*⁺ (Miklos *et al.*, 2008), while the *sep10/med31*⁺ and *sep11/med18*⁺ play roles

in the regulation of the *aff1/stell1*⁺ transcription (Szilagyi *et al.*, 2002). Comparing these results with the above we can say that the SAGA and Mediator complexes are needed for *ace2*⁺ and *aff1/stell1*⁺ expression. Furthermore, we also showed that the *sep10⁻ sep11⁻* and *sep11⁻ sep15⁻* mutation pairs are synthetically lethal (Miklos *et al.*, 2008). In this study we also tried to create *sep9⁻ sep10⁻*, *sep9⁻ sep11⁻* and *sep9⁻ sep15⁻* double mutants by somatic hybridization, but only the *sep9⁻ sep10⁻* double mutant proved to be viable. These results with the findings above tell us that these complexes not only cooperate in *aff1/stell1*⁺ or *ace2*⁺ transcription, but also participate directly in the regulation of other genes. Moreover it is likely that if both of the complexes are impaired, the transcription of certain essential genes drops so much that the cell can not tolerate. It is also possible that cells die because the expression of many genes drops. Our findings are in good agreement with the literature. For example in *S. cerevisiae* similar results were found: combining of particular SAGA and Mediator subunit mutations were found to be lethal for cells (Roberts and Winston, 1997; Larschan and Winston, 2005).

We also examined the possible relationships between *Sch. pombe* Sep9 and other species' presumed orthologs with bioinformatic tools, and an interspecific complementation experiment was also done. Analysing the sequences of different species we found possible orthologs such as in *S. cerevisiae* the *SPT8*, in *Aspergillus niger* the An07g04000, in *Coccidioides immitis* the CIMG_06699 and in *Yarrowia lipolytica* the YALI0E23804 proteins. The similarity degrees were different. Of course the highest similarities were found in the *Schizosacharomyces* group. *Sch. octosporus* SOCG_02609.2 showed 73%, while *Sch. japonicus* SJAG_02066.2 showed 61% of identity with *Sch. pombe* Sep9 protein. It is shown that the expression of *S. cerevisiae* Spt8 can not restore the wild phenotype in *sep9⁻*

mutants (Batta *et al.*, 2009), which may be due to the limited similarity. We also attempted interspecific complementation with *Sch. japonicus* SJAG_02066.2 in *Sch. pombe sep9⁻* mutants (cloning primer pair: Sj.sep9s and Sj.sep9aBamHI), but the experiment was not successful, although there is a high similarity between the protein products of the two species. This is probably due to the high variability in the highly acidic N-terminal region, both in length and sequence, which is characteristic for every species. It is possible, that these variable regions help to adapt the proteins to the different cellular environments specific for the different species.

4. Summary

The cytokinesis has been studied intensively in the past 15 years at the Department of Genetics and Applied Microbiology, University of Debrecen. As a model organism *Sch. pombe* has been used, since it possesses numerous features that are very similar to those of the mammalian cells. In the 1990s several cytokinesis mutants have been isolated in the department. In these mutants the original unicellular phenotype became multicellular since the septa between the cells were not split. They were designated „sep” (separation) mutants. It was also found that some of these mutants are affected not only in the cell division cycle, but also in their sexual differentiation and stress response. *Sep1*⁺ was found to code for a fork-head type DNA binding transcription factor that plays an important role in cytokinesis. *Sep10*⁺, *sep11*⁺ and *sep15*⁺ are homologs of *S. cerevisiae* Mediator complex subunit coding *MED31*, *MED18* and *MED8* genes, respectively.

In this PhD study we analysed the role of the *Sch. pombe sep9*⁺ gene, and the molecular basis of the *sep9*⁻ phenotype. We showed that *sep9*⁺ encodes a putative SAGA subunit. This is supported by the Sep9 sequence similarity with the yeast *S. cerevisiae* Spt8 protein, which is a SAGA subunit. Further investigation proved that although there is 31% of sequence identity between the two proteins, its overproduction in *sep9*⁻ mutant cells can not restore the wild phenotype. Even a closer relative, the *Sch. japonicus*’ putative Sep9 homolog, could not restore the wild phenotype in *Sch. pombe sep9*⁻ mutant.

Two major characteristics of the *sep9*⁻ mutants are the hyphal growth and the inability to carry out the sexual differentiation. The complete deletion of *sep9*⁺ gene resulted in viable mutants, which means that the gene is not essential. The *sep9Δ* mutant has almost the same phenotype as the

sep9-307 point mutant has, but it grows slower at permissive temperature, and its cells die at 37°C in contrast to the viability of the point mutant. *Sep9*⁻ mutant cells show the same sensitivity to the transcription elongation inhibitor micophenolic acid as the wild type cells do.

In our gene expression experiments we have found that *ace2*⁺ - which codes for a direct master regulator of the final step in cytokinesis - is downregulated. *Ace2* targets, that have also been tested, show low level of expression. Moreover *eng1*⁺ was even more downregulated if compared to *ace2*⁺. This *ace2*⁺ downregulation by itself might be sufficient to elicit the partial cell separation defect of the *sep9*⁻ mutant cells, but a direct involvement of *Sep9* in the expression of the downstream genes is also possible. Interestingly, the overproduction of *Ace2* in *sep9*⁻ strains, almost completely restored the wild type phenotype, which contradicts the theory outlined above.

We also have found that in *sep9*⁻ mutational background the transcription level of sexual differentiation key regulator *aff1/ste11*⁺ was decreased. On the other hand, the ectopic production of *Aff1/Ste11* did not completely restore the wild phenotype, so there must be other genes in the process of sexual differentiation that are affected.

Since the inactivation of some Mediator subunits also causes cell separation defects, we analysed the effect of the combination of mutations on the cell. To study possible genetic interactions we generated double mutants with somatic hybridisation and recombination. By the tetrad analysis we found that only the *sep9*⁻ *sep10*⁻ double mutant was viable. We obtained neither *sep9*⁻ *sep11*⁻ nor *sep9*⁻ *sep15*⁻ viable double mutants. Presumably, the simultaneous impairment of the activity of the SAGA and Mediator complexes affects the transcription of so many genes that the cells can not tolerate and they die.

From these results we can conclude that *sep9*⁺ codes for a transcription factor, which plays a key role in both cytokineses and in sexual differentiation. If the Sep9 protein is impaired or absent, then several abnormal features turn up, but none of them are lethal for the cell. According to our data, the Sep9, Sep10/Med31, Sep11/Med18 and Sep15/Med8 all affect cell separation genes and it is possible that they share numerous target genes in common.

Further research is necessary to explore the role of Sep9 in the regulation of cytokinesis and sexual differentiation by identifying other target genes with the use of quantitative real-time PCR and possibly by DNA microarrays. Characterisation of the yet unidentified “*sep*” genes and studying biochemical interactions of “Sep” proteins would also contribute to the better understanding of these regulatory networks that seem to control these independent cell processes.

5. Irodalomjegyzék/References

- Alfa C, Fantes P, Hyama J, McLeod M, Warbick E. Experiments with fission yeast: A laboratory course manual, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993.
- Bähler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14:943-951, 1998.
- Baker SP, Grant PA. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* 26:5329-5340, 2007.
- Batta G, Szilagy 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.
- Buck V, Ng SS, Ruiz-Garcia AB, Papadopoulou K, Bhatti S, Samuel JM, Anderson M, Millar JB, McInerney CJ. Fkh2p and Sep1p regulate mitotic gene transcription in fission yeast. *J Cell Sci* 117:5623-5632, 2004.
- Casamassimi A, Napoli C. Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. *Biochimie* 89:1439-1446, 2007.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
- Daniel JA, Grant PA. Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes. *Mutat Res* 618:135-148, 2007.
- Desmoucelles C, Pinson B, Saint-Marc C, Daignan-Fornier B. Screening the yeast "disruptome" for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *J Biol Chem* 277:27036-27044, 2002
- Egel R, Willer M, Kjaerulff S, Davey J, Nielsen O. Assessment of pheromone production and response in fission yeast by a halo test of induced sporulation. *Yeast* 10:1347-1354, 1994.
- Eisenmann DM, Chapon C, Roberts SM, Dollard C, Winston F. The *Saccharomyces cerevisiae* *SPT8* gene encodes a very acidic protein that is functionally related to *SPT3* and TATA-binding protein. *Genetics* 137:647-657, 1994.
- Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6 (alpha2). Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA. 2001.
- Grallert A, Grallert B, Zilahi E, Szilagy Z, Sipiczki M. Eleven novel *sep* genes of *Schizosaccharomyces pombe* required for efficient cell separation and sexual differentiation. *Yeast* 15:669-686, 1999.
- Grant PA, Duggan L, Côté J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL, Workman JL. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit

- complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* 11:1640-1650, 1997.
- Gutz H, Heslot H, Leupold U, Loprieno N. *Schizosaccharomyces pombe*. In Handbook of genetics. Edited by King RC, Plenum Press, New York, pp. 395-446, 1974.
- Keeney JB, Boeke JD. Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136:849-856, 1994.
- Larschan E, Winston F. The *Saccharomyces cerevisiae* Srb8-Srb11 complex functions with the SAGA complex during Gal4-activated transcription. *Mol Cell Biol* 25:114-123, 2005.
- Miklos I, Szilagy Z, Watt S, Zilahi E, Batta G, Antunovics Z, Enczi K, Bähler 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.
- Mitchison, M. Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Cell Physiology*, Academic Press, 131-165, 1970.
- Moreno S, Klar A, Nurse P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194:795-823, 1991.
- Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357-358, 1996.
- Petit CS, Mehta S, Roberts RH, Gould KL. Ace2p contributes to fission yeast septin ring assembly by regulating *mid2+* expression. *J Cell Sci* 118:5731-5742, 2005.
- Ribár B, Bánrévi A, Sipiczki M. *Sep1+* encodes a transcription-factor homologue of the HNF-3/forkhead DNA-binding-domain family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 202:1-5, 1997.
- Roberts SM, Winston F. Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/Mediator complexes. *Genetics* 147:451-465, 1997.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sipiczki M. The role of sterility genes (*ste* and *aff*) in the initiation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 213:529-534, 1988.
- Sipiczki M. Splitting of the fission yeast septum. *FEMS Yeast Res* 7:761-770, 2007.
- Sipiczki M, Ferenczy L. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* Auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol Gen Genet* 151:77-81, 1977.

- Sugimoto A, Iino Y, Maeda T, Watanabe Y, Yamamoto M. *Schizosaccharomyces pombe* *stel1*⁺ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* 5:1990-1999, 1991.
- Szilagyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M. Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. *Gene* 348:101-109, 2005.
- Szilagyi Z, Grallert A, Nemeth N, Sipiczki M. The *Schizosaccharomyces pombe* genes *sep10* and *sep11* encode putative general transcriptional regulators involved in multiple cellular processes. *Mol Genet Genomics* 268:553-562, 2002.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680, 1994.
- Zilahi E, Miklos I, Sipiczki M. The *Schizosaccharomyces pombe* *sep15*⁺ gene encodes a protein homologous to the Med8 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional Mediator complex. *Curr Genet* 38:227-232, 2000.

6. Publikációs jegyzék/Publication list

A tézisek alapjául szolgáló szolgáló publikációk / Publications relevant in the thesis

Batta G, Szilágyi 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. IF: 2,812.

Miklos I, Szilágyi Z, Watt S, Zilahi E, **Batta G**, Antunovics Z, Enczi K, Bähler 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. IF: 2,978.

A témában megjelent egyéb publikációk / Other publications in the subject

Szilágyi Z, **Batta G**, Enczi K, Sipiczki M. Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. Gene 348:101-109, 2005. IF: 2,871.

Előadások és posztterek / Presentations and posters

Batta G, Szilágyi Z, Sipiczki M. Functional analysis of two novel fork-head transcription factors of fission yeast. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2003.

Batta G, Szilágyi Z, Miklós I, Sipiczki M. Mediátor gének funkcionális analízise hasadóélesztőben. "Genetikai Műhelyek Magyarországon" c. konferencia, 2005.

Miklós I, Szilágyi Z, Benkő, Z, Enczi K, **Batta G**, Sipiczki M, Bähler J. Analysis of transcriptional profiles of *S. pombe* sep10 and sep15 mutant

- strains, which encode subunits of the Mediator. XXIInd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. *Yeast* 22:S152, 2005.
- Batta G**, Nagy R, Antunovics Z, Miklós I, Szilágyi Z, Bähler J, Sipiczki M. Transcriptional regulation by Mediator subunits in *Schizosaccharomyces pombe*. Ann. Meeting Hung. Soc. Microbiol. Acta Microbiol Immunol Hung 53: 247, 2006.
- Batta G**, Szilágyi Z, Sipiczki M. A *sep9* transzkripciós regulátor szerepének vizsgálata hasadóélesztőben. MTA Magyar Tudomány Napja, 2006.
- Sipiczki M, Miklós I, Szilágyi Z, **Batta G**. General transcription regulators (Mediator and SAGA) and fork-head transcription factors in the regulation of cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. 34th Annual Conference on Yeasts. Czechoslovak Society for Microbiology. Book of Abstracts pp. 30, 2006.
- Batta G**, Szilágyi Z, Sipiczki M. A *sep9* transzkripciós faktort kódoló gén funkcionális vizsgálata hasadóélesztőben. VII. Magyar Genetikai Kongresszus/XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2007.
- Miklós I, Szilágyi Z, Watt S, Zilahi E, **Batta G**, Antunovics Z, Enczi K, Nagy R, Szászi E, Bähler J, Sipiczki, M. Transcriptional regulation in *Schizosaccharomyces pombe* cells. 15th Internat. Cong. Hung. Soc. Microbiol. Acta Microbiol Immunol Hung 54: 83-84, 2007.
- Szilágyi Z, Linder T, Miklós I, **Batta G**, Sipiczki M, Gustafsson CM. The role of the Mediator complex in the regulation of cell separation. Fourth International Fission Yeast Meeting. Book of Abstracts pp. 257, 2007.
- Batta G**, Szilágyi Z, Sipiczki M. Functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *SPT8* homologue *sep9* gene in *Schizosaccharomyces pombe*. Fourth Hungarian Conference of Mycology. Acta Microbiol Immunol Hung, 55: 176, 2008.

- Batta G**, Miklós I, Szilágyi Z, Sipiczki M. Általános transzkripció faktorok (a Mediátor és a SAGA komplex) szerepének genetikai elemzése a *Schizosaccharomyces pombe* sejtciklusának szabályozásában. “Genetikai Műhelyek Magyarországon” c. konferencia, 2008.
- Batta G**, Szászi E, Nagy R, Miklós I, Sipiczki M. Cell separation genes and their transcriptional regulators in *Schizosaccharomyces pombe*. Fourth Hungarian Conference of Mycology. Acta Microbiol Immunol Hung 55:176, 2008.
- Miklós I, Szilágyi Z, Watt S, Zilahi E, **Batta G**, Antunovics Z, Enczi K, Bähler J, Sipiczki M. *Sch. pombe* Mediátor alegységek szerepe a citokinezis transzkripció szabályozásában. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus/XV. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok. Program Összefoglaló 42. oldal, 2009.
- Sipiczki M, Miklós I, **Batta G**, Szászi E, Nagy R. Többszintű genetikai szabályozás a sejtciklus végén: a szeptumhasítás génjei a *Schizosaccharomyces pombe*-ben. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus/XV. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok. Program Összefoglaló 41. oldal, 2009.