

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei
Thesis of PhD dissertation

**A *SCHIZOSACCHAROMYCES JAPONICUS*
SEJTSZEPARÁCIÓBAN RÉSZTVEVŐ GÉNJEINEK
VIZSGÁLATA**

**INVESTIGATION OF THE *SCHIZOSACCHAROMYCES*
JAPONICUS GENES WHICH PLAY ROLES IN CELL
SEPARATION**

Balázs Anita

Témavezető/Supervisor: Dr. Sipiczki Máttyás



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2012

1. Bevezetés és célkitűzés

A *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* (a továbbiakban *Sch. japonicus*) egy a Schizosaccharomycetales-rendbe tartozó egyszélű hasadóélesztő, melynek CBS 354 elnevezésű törzsét eperből erjesztett borból izolálták [Yukava és Maki, 1931]. A rokon fajhoz, a klasszikus és molekuláris genetika kedvelt modellszervezetéhez, a *Sch. pombe*-hez hasonlóan haploid genetikai állománnyal rendelkezik, amely lehetővé teszi, hogy a recesszív mutációk fenotípusosan is megnyilvánuljanak. A *Sch. japonicus* életciklusára, szemben az *Sch. pombe* egyszélű haploid életmenetével, a dimorfizmus jellemző: a fiatal telepek egyedi sejtjei szilárd táptalajon 8-10 nap elteltével többszélű hifát fejlesztenek [Sipiczki és mtsai, 1998]. A *Sch. japonicus* ugyan nem patogén, de mivel egyes patogén fajokban, mint például a növényi *Ustilago maydis*-ban [Bölker, 2001], humán patogénekben, például a *Candida albicans*-ban [Gow & Gooday, 1987] és a *Histoplasma capsulatum*-ban [Eisenberg és mtsai, 1996] a dimorfizmus virulenciafaktorként szerepel, a *Sch. japonicus* vizsgálata hozzásegíthet a dimorf gombák virulenciájának megértéséhez, azon keresztül új gombaellenes terápiák kidolgozásához. Mindezek miatt a *Sch. japonicus* nemrégiben ígéretes modellorganizmussá vált [pl. Rhind és mtsai, 2011]. A genomszekvenciája teljes mértékben elérhető vált [Broad Institute internetes honlapján], amely lehetővé tette génjeinek klónozását és szerepük vizsgálatát.

A Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén hagyománya van az élesztő sejtciklus kutatásának. A sejtciklus utolsó lépése a sejtszeparáció és citokinézis, ennek tanulmányozásába kapcsolódtam bele. A *Sch. pombe* citokinézise során először egy szeptum képződik, később az osztódással létrejött leánysejtek elválnak az elsődleges szeptum feloldásával. Az érett szeptum egy három lemezből álló struktúra, amely egy belső elsődleges és az azt két oldalról határoló másodlagos szeptumokból épül fel [Johnson és mtsai, 1973]. Az *Sch. pombe* sejtszeparációban részt vevő génjeinek funkciója alaposan tanulmányozott tudományterület. Ezek a gének egy regulációs útvonalon találhatóak. A folyamat két fő transzkripciósfaktora a Sep1p és Ace2p fehérjék [Sipiczki és mtsai, 1993; Martin-Cuadrado és mtsai, 2003]. A *sep1*⁺ az elsőként leírt sejt-szeparációs gén [Sipiczki és mtsai, 1993], amely azonban a sejtszeparáción kívül egyéb folyamatokban is szerepet játszik [Rustici és mtsai, 2004]. A Sep1p egy fork-head típusú DNS kötő domént

tartalmaz. A *sep1*⁺ mRNS szintje nem mutat periódicitást a sejtciklus alatt [Zilahi és mtsai, 2000], tehát a gén aktivitása valószínűleg poszt-transzkripciósan szabályozódik. A *sep1Δ* sejtek nem képesek elválni egymástól, hifás növekedést mutatnak [Sipiczki és mtsai, 1993]. Az *ace2Δ* sejtek szintén hifás növekedést mutatnak a *sep1Δ* mutánsához hasonlóan, és az *ace2*⁺ túltermelés elnyomja a *sep1Δ* fenotípust [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003], tehát a Sep1p az *ace2*⁺ génen keresztül szabályoz. Az *ace2*⁺ egy cink-ujj transzkripciósi faktort kódol [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003], ami foszforilációval poszttranszlációsan szabályozódik, és valószínűleg a Cdc2p ciklin dependens kináz, sejtciklus fehérje is regulálja ily módon [Petit és mtsai, 2005]. A Sep1p-Ace2p transzkripciósi szabályozók több célgénnel is rendelkeznek. Az *eng1*⁺ gén terméke egy β -1,3 endoglukanáz, ami az elsődleges szeptum elbontásában szerepel; az *agn1*⁺ által kódolt fehérje, az Agn1p, ami egy α -1,3 glukánáz, pedig a szeptum szélénél levő, a még szét nem vált sejtek sejtfalának hidrolízisében vesz részt [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003; Dekker és mtsai, 2004; Garcia és mtsai, 2005]. A *mid2*⁺ gén által biztosított Mid2p protein szerepe az ún. szeptin gyűrű létrehozásában van, amely segíti az Agn1p és Eng1p enzimek exocitózisát [Berlin és mtsai, 2003; Tasto és mtsai, 2003].

A *Sch. pombe* Sep1p, Ace2p, Agn1p, Eng1p, Mid2p fehérjékhez nagyon hasonló szekvenciájú fehérjéket kódoló gének megtalálhatóak a *Sch. japonicus* genomjában, melyek szerepe munkánk kezdetekor még nem volt ismert ebben a fajban. Megismerésük fontos lehet, mert a *Sch. japonicus* fonalas növekedésre is képes, és ebben a morfológiai formában látszólag feleslegessé válnak ezek a gének, vizsgálatuk tehát új információkat szolgáltathat a dimorfizmus szabályozásáról.

Ezek alapján a következő célokat tűztük ki:

1. Az említett génekből mutáns *Sch. japonicus* törzsek létrehozása és a mutáns fenotípusok vizsgálata.
2. A sejtseparációs mutánsok hifaképzésének és hifa darabolódásának tanulmányozása (az érintett gének szerepe az élesztős és fonalas fázisok közötti átváltásban).

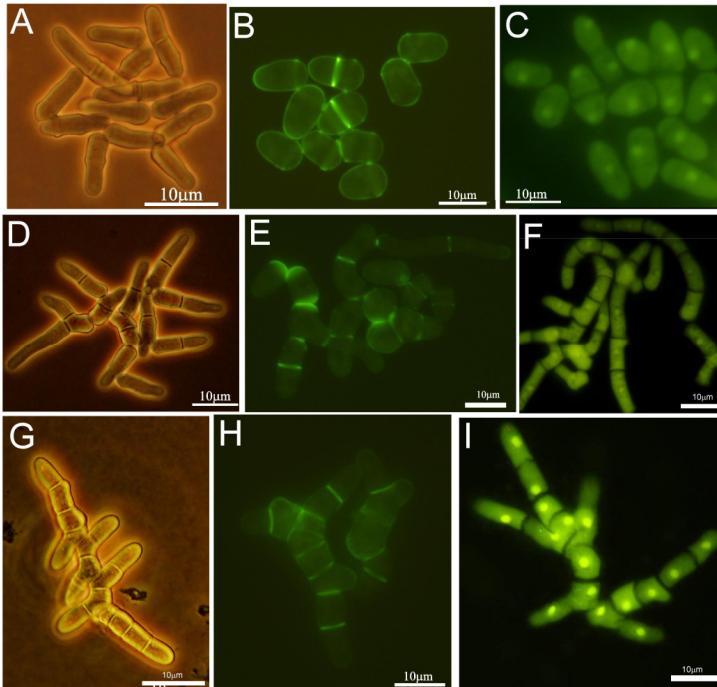
- 3 Megvizsgálni, hogy a *Sch. japonicus* sejtszeparációs fehérjei képesek-e a nagy hasonlóságú génekben mutáns *Sch. pombe* törzsek fenotípusát komplementálni (funkcionális homológia vizsgálata).
- 4 A *Sch. japonicus* sejtszeparációs gének funkció vizsgálata fajon belül:
 - a. A *sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}* inaktiválásának vizsgálata más sejtszeparációs gének működésére.
 - b. A *Sch. japonicus* Eng1p^{Sj}, Agn1p^{Sj}, Mid2p^{Sj} fehérje GFP jelölése és sejten belüli lokalizálása.

2. Új tudományos eredmények

2.1. A *Sch. japonicus* feltételezhetően sejtszeparációs génjeinek inaktiválása és a létrehozott fenotípusok vizsgálata

Bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk a dimorf *Sch. japonicus* feltételezhetően sejtszeparációban résztvevő génjeit (*sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}*, *eng1^{Sj}*, *agn1^{Sj}*, *mid2^{Sj}*), és sikeresen inaktiváltuk őket. A *sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}*, *eng1^{Sj}* gének esetében a *Sch. pombe ura4⁺* gént tartalmazó génkiütéses kazettával végeztük el a részleges génmegszakítást. Azt használtuk fel, hogy a *Sch. pombe ura4⁺* képes komplementálni a *Sch. japonicus ura4⁺* fenotípusát [Furuya és Niki, 2009]. A *Sch. japonicus ura4⁺* törzset használtuk ugyanis ezeknek a géneknek a kiütéséhez. Az *agn1^{Sj}*, *mid2^{Sj}* géneknél kanamycin rezisztencia gént tartalmazó kazettával végeztük a gének teljes kiütését, egyúttal azt is megállapítva, hogy ez a génkiütéses rendszer a *Sch. japonicus*-ban is alkalmazható.

Megvizsgáltuk a mutánsok fenotípusait. A mutáns fenotípusok hasonlóan bizonyultak a homológ génekben mutáns *Sch. pombe*-éhoz. A vad típusú *Sch. japonicus* sejtek hengeresek (**1/A. ábra**), egy sejtmagot tartalmaznak (**1/C. ábra**) és csak az osztódásban levők rendelkeznek szeptummal (**1/B. ábra**). A *sep1^{Sj}* (**1/D-F. ábra**) *ace2^{Sj}* (**1/E-I. ábra**) és *agn1^{Sj}* (**2/D-F. ábra**) mutánsok egyértelműen fonalas morfológiát mutattak az élesztőfázisban, a sejtek több szeptummal rendelkező sejtláncokat hoztak létre. Az *eng1^{Sj}* és *mid2^{Sj}* mutációk hatása a sejtszeparációra ugyanúgy kevésbé szembetűnő, mint a *Sch. pombe* esetében, mivel a sejtláncképzés kisebb mértékű.

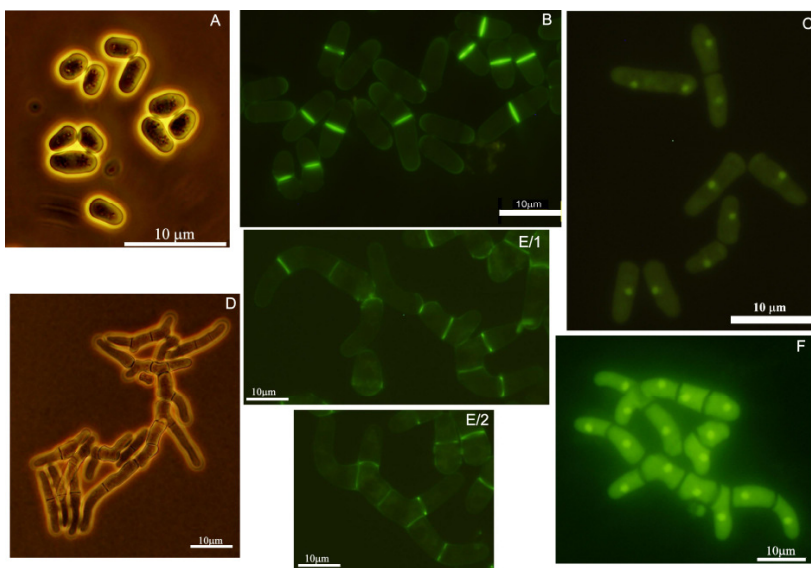


1. ábra

A (A-C) *Sch. japonicus* vad típusú (7-1), (D-F) *sep1^{Si::ura4+}* (7-254) (G-I) *ace2^{Si::ura4+}* (7-258) sejtek mikroszkópi morfológiája. 'A, D, G': fáziskontraszt 'B, E, H': calcofluorral festett sejtek fluoreszcens mikroszkópi megjelenése; 'C, F, I': DAPI-val festett sejtek fluoreszcens mikroszkópi megjelenése.

Figure 1

The microscopic morphology of the *Sch. japonicus* (A-C) wild type (7-1), (D-F) *sep1^{Si::ura4+}* (7-254) and (G-I) *ace2^{Si::ura4+}* (7-258) cells. 'A, D, G': phase contrast morphology 'B, E, H': calcofluor staining of cells, 'C, F, I': DAPI staining of cells.



2. ábra

A (A-C) *Sch. pombe agn1Δ* (2-1402), (D-F) és *Sch. japonicus agn1^{Sj}Δ* (7-256) sejtek mikroszkópi morfológiája: 'A, D': fáziskontraszt felvétel; 'B, E': calcofluorral festett sejtek fluoreszcens mikroszkópi megjelenése; 'C, F': DAPI-val festett sejtek fluoreszcens mikroszkópi megjelenése.

Figure 2

Microscopic morphology of the (A-C) *Sch. pombe agn1Δ* (2-1402), and (D-F) *Sch. japonicus agn1^{Sj}Δ* (7-256) cells: 'A, D': phase contrast morphology; 'B, E': calcofluor-staining of cells, 'C, F': DAPI-staining of cells.

A fenotípus hasonlóság alapján valószínűsítjük, hogy a *Sch. japonicus*-ban is hasonló feladatot láthatnak el ezek a gének, mint a *Sch. pombe*-ben, ahol a szerepük a sejtszeparációban egyértelműen bizonyított a mutánsok mérsékelt defektusai ellenére is. Az *agn1^{Sj}* gének feltehetőleg nagyobb a szerepe a *Sch. japonicus*-ban, mint a *Sch. pombe*-ben, ahol a mutáns sejtek csak kismértékű sejtszeparációs

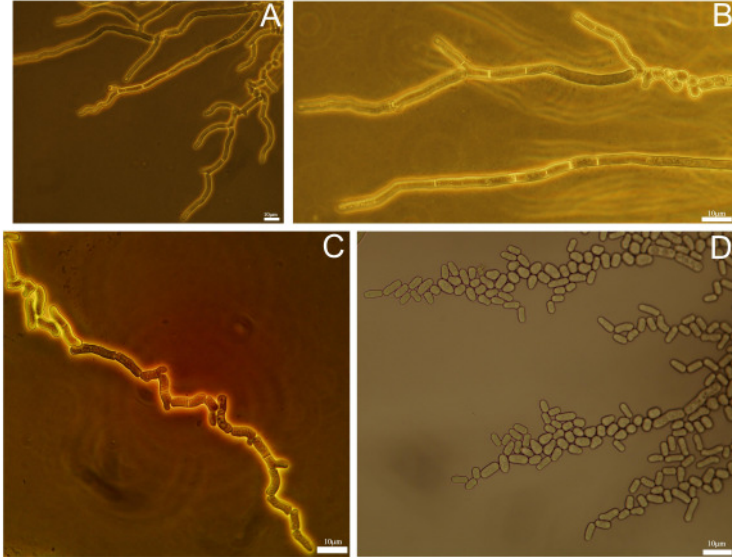
defektussal rendelkeznek (**2/A-C. ábra**), míg a *Sch. japonicus agn1 Δ ^{Si}* fenotípus a szabályozógénnek (*sep1^{Si}*, *ace2^{Si}*) mutáns megjelenéséhez hasonló (**2/D-F. ábra**).

2.2. A sejtszeparációs mutánsok fenotípusa a micéliumos fázisban

A *Sch. japonicus* szilárd táptalajon 8-10 nap elteltével unipolárisan növekvő hifákat képez [Sipiczki és mtsai, 1998]. Ezeknek a hifáknak a létrejöttét a nitrogén éhezés váltja ki, mindig a táptalaj nitrogénben gazdagabb részei felé nőnek. Ha nitrogén forrást juttatunk a hifák közelébe, azok abbahagyják a megnyúlást, feldarabolódnak és visszatérnek az élesztőfázisba, ahol ismét bipolárisan növekednek [Sipiczki és mtsai, 1998].

A sejtszeparációs *Sch. japonicus* mutánsoknak megvizsgáltuk a hifaképzését és hifadarabolódását. Az eredmények hasonlóak mind az öt vizsgált mutáns törzsben, ezért a hifaképzést és hifa darabolódást csak az egyik mutáns (a *sep1^{Si}*) példáján mutatjuk be.

A *Sch. japonicus sep1^{Si}::ura4⁺* (7-254) mutáns (**4/A. ábra**) hifái a vad típusú (7-1) törzs hifáihoz (**3/A. ábra**) hasonlóan nőnek, mindig a szeptum alatt ágaznak el, újabb hifákat képezve. Tehát a *sep1^{Si}* gén inaktiválása nem befolyásolja az élesztő-hifa átváltást és a hifanövekedést. Megvizsgáltuk, hogy a *sep1^{Si}* inaktiválása befolyásolja-e a hifák feldarabolódási képességét. Azt tapasztaltuk, hogy a *sep1^{Si}::ura4⁺* mutáns (7-254) is szeptumokat hoz létre nitrogén hozzáadására a hifáiban, ugyanúgy, mint a vad törzs (**3/B. ábra**). A vad típusú törzs hifái idővel teljesen feldarabolódnak (**3/C, D. ábra**). A *sep1^{Si}* mutánsban viszont a szeptólódást nem követi a szeptumok feloldódása. A feldarabolódás elmaradása ellenére a sejtek visszatérnek az élesztő stádiumra jellemző bipoláris növekedésre. Erre abból lehet következtetni, hogy a közöttük levő szeptumoknál oldalra kinőnek, mégpedig mindkét végüknél (**4/C és D. ábra**, piros nyilakkal vannak jelölve). Az utóbbi az unipoláris hifáknál nem következik be [Sipiczki és mtsai, 1998]. Azok mindig csak az egyik végükön tudnak nőni. A későbbiek során egyes szeptumoknál bekövetkezik hasadás, azaz a hifa helyenként feldarabolódik, ez azonban már annak köszönhető, hogy a bipolárisan növekedő sejtek végei egymásnak feszülve fizikailag hasítják a szeptumokat (**4/E, F. ábra**).



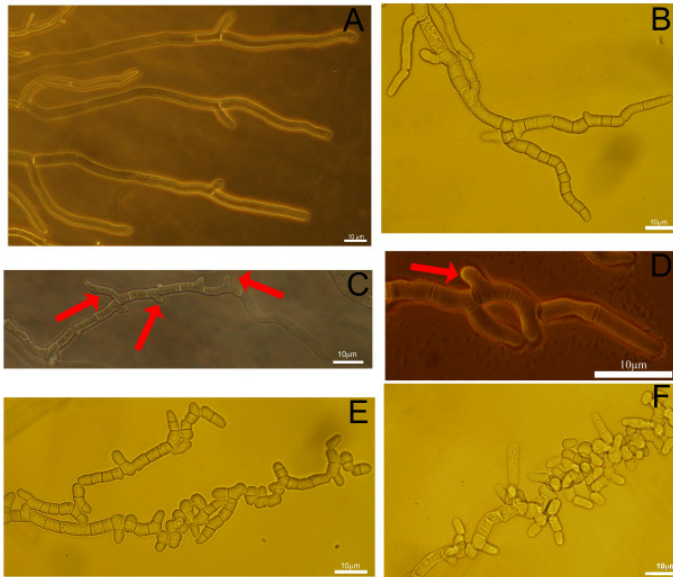
3. ábra

A vad típusú *Sch. japonicus* (7-1) hifái. (A) Hifanövekedés nitrogén hozzáadása nélkül, illetve (B-D.) nitrogén forrás hozzáadása után (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).

Figure 3

Hyphae of the wild type *Sch. japonicus* (7-1). (A) Hyphae growing before and (B-D) after and supplementation of the medium with nitrogen source (light and phase contrast microscopy).

A többi vizsgált mutánsban (*ace2^{Sj}*, *eng1^{Sj}*, *agn1^{Sj}*, *mid2^{Sj}*) is a *sep1^{Sj}* mutánsához hasonló módon lépnek vissza a sejtek a vad típusú törzshöz képest az unipoláris fonalas növekedésből az élesztőre jellemző bipoláris növekedésre a szeptum feloldási nehézségeik miatt. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy ezek a gének nem játszanak szerepet a micéliális növekedésben, de részt vesznek közvetlenül vagy közvetve a *Sch. japonicus* hifa-élesztő átalakulásának végrehajtásában.



4. ábra

A *Sch. japonicus sep1^{Sl::ura4+}* (7-254) hifa növekedése (A) hozzáadott nitrogén forrás nélkül; illetve (B-F) nitrogén hozzáadása után. Piros nyilakkal vannak jelölve azok a helyek, ahol a hifa a növekedéssel ellentétes irányban is kihajt (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).

Figure 4

Growing of the *Sch. japonicus sep1^{Sl::ura4+}* (7-254) hyphae (A) before and (B-F) after supplementation of the medium with nitrogen source. The sites where the hyphae grow laterally above the septa are marked with red arrows. (light and phase contrast microscopy).

2.3. A sejtszeparációs gének expressziójának megvalósítása a rokonfaj *Sch. pombe*-ben

A pREP expressziós vektorsorozat segítségével megvalósítottuk a *sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}* *agn1^{Sj}*, *eng1^{Sj}* gének különböző szintű expresszióját a *Sch. pombe*-ben, és megvizsgáltuk, hogy a géntermékek képesek-e a homológ génekben mutáns fenotípust komplementálni.

A *Sch. japonicus sep1^{Sj}* és *ace2^{Sj}* közepes és alacsony szintű termeltetése révén a *Sch. pombe*-ben mérséklődik a *sep1⁻* és *ace2⁻* mutációkra jellemző fenotípus. A normál, szeptum nélküli, és osztódó egy szeptumos sejtek száma magasabb, míg a két-, és több szeptumos sejteké alacsonyabb a mutánsokhoz viszonyítva.

A *Sch. japonicus Agn1p^{Sj}* fehérje hatására csökken a szeptummal rendelkező, illetve szét nem vált sejtek aránya a *Sch. pombe agn1⁻* mutánsban.

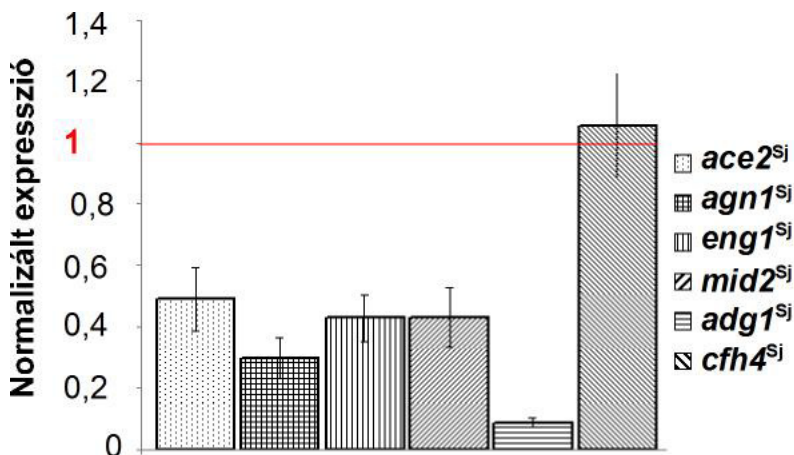
Az Eng1p nem esszenciális a sejtosztódáskor, ezért komplementáló hatását nehéz vizsgálni. A különbséget a sejtosztódási ciklus hosszában, a szeptumfeloldás sebességében találtuk mikroszkópikus time-lapse vizsgálattal. A *Sch. japonicus eng1^{Sj}* génjével transzformált *Sch. pombe* törzs a vad típusnál lassabban, a mutánsnál viszont gyorsabban jut el a szeptum megjelenésétől a kezdeti feloldás időpontjáiig.

Tehát mind a négy gén esetében azt tapasztaltuk, hogy a *Sch. japonicus* sejtszeparációs fehérjék képesek részlegesen komplementálni a rokonfaj *Sch. pombe* mutáns fenotípusát. Ez alapján megállapítható, hogy a két faj sejtszeparációs génei között meglévő szekvenciális hasonlóság lehetővé teszi a funkcionális felcserélhetőséget is.

2.4. A *Sch. japonicus sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}* gének inaktíválásának hatása más sejtszeparációs gének működésére

Kvantitatív PCR vizsgálatokkal megvizsgáltuk, hogy a két szabályozógénben (*sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}*) mutáns *Sch. japonicus* törzsekben a feltételezhető célgének mRNS szintje hogyan változik. Azt tapasztaltuk, hogy a *sep1^{Sj}::ura4⁺* és *ace2^{Sj}::ura4⁺* mutánsokban a *cfh4^{Sj}* gén mRNS-ének kivételével az összes vizsgált gén (*agn1^{Sj}*, *eng1^{Sj}*, *mid2^{Sj}*, *adg1^{Sj}*) mRNS szintje lecsökken a vad típusban mért (1 relatív

értéknek vett) szintjükhöz képest (az **5. ábrán** a *sep1^{Sj}* mutánsban mért adatok láthatóak, az *ace2^{Sj}* mutáns hasonló eredményeket mutatott).



5. ábra

A sejtszeparációban résztvevő gének mRNS szintjének meghatározása a *sep1^{Sj}::ura4⁺* (7-254) *Sch. japonicus*-ban a vad típusú (7-1) törzs mRNS szintjéhez (1-nek tekintett relatív érték pirossal jelölve) viszonyítva qPCR-rel.

Figure 5

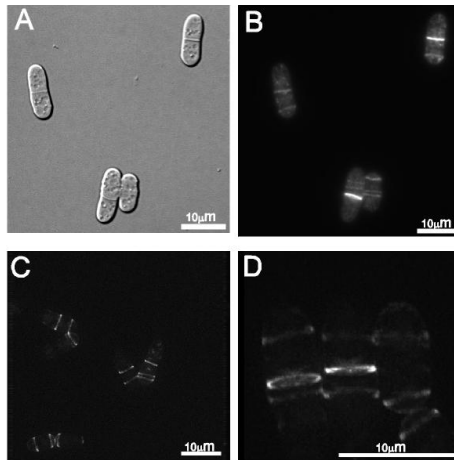
Identification of the mRNA level of the genes playing roles in cell separation with qPCR in the *Sch. japonicus sep1^{Sj}::ura4* (7-254) compared to the mRNA level (which is considered as 1 value, it is signed with red) of the of wild type (7-1).

Tehát megállapíthatjuk, hogy a *Sch. japonicus*-ban is a Sep1p^{Sj} és Ace2p^{Sj} fehérjék szabályozzák az *agn1^{Sj}*, *eng1^{Sj}*, *mid2^{Sj}*, *adg1^{Sj}* gének transzkripció szintjét a *Sch. pombe*-hoz hasonlóan. A gének mRNS szintje nem csökken le a szabályozó gének hiányában nullára, tehát kis mértékű átíródásuk ekkor is megtörténik. A *sep1^{Sj}* mutánsban az *ace2^{Sj}* gén mRNS szintje is lecsökkent a vad típushoz képest, tehát az *ace2^{Sj}* gén maga is a *sep1^{Sj}* szabályozása alatt áll, ugyanúgy mint a homológja a *Sch.*

pombe-ben [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003]. A Sep1p^{Sj} és Ace2p^{Sj} fehérjék a *cfh4*^{Sj} mRNS szintjének szabályozásában valószínűleg nem vesznek részt.

2.5. A *Sch. japonicus* *eng1*^{Sj}, *agn1*^{Sj} és *mid2*^{Sj} géntermékek lokalizációjának vizsgálata

Megvizsgáltuk az *eng1*^{Sj}, *agn1*^{Sj} és *mid2*^{Sj} géntermékek sejten belüli lokalizációját GFP fúziós proteinek segítségével.



6. ábra

A Mid2p^{Sj}-GFP lokalizációja *Sch. japonicus* sejtekben.

A *Sch. japonicus* *ura4*^{Sj}Δ *mid2*^{Sj}-GFP-kanMX sejtek (7-257) mikroszkópi morfológiája: (A) DIC morfológia, (B-D) fluoreszcens mikroszkópia.

Figure 6

The localisation of Mid2p^{Sj}-GFP in *Sch. japonicus* cells.

(A) Microscopical morphology of *Sch. japonicus* *ura4*^{Sj}Δ *mid2*^{Sj}-GFP-kanMX cells (7-257), DIC morphology; (B-D) fluorescent microscopy.

Az Agn1p^{Si}-GFP és az Eng1p^{Si}-GFP sejten belüli elhelyezkedését feltehetően technikai problémák miatt nem tudtuk tisztázni. További kísérletek szükségesek, hogy a működő fehérjék sejten belüli helyét vizsgálhassuk.

A Mid2p^{Si}-GFP fehérje megfigyelhető volt. Egy gyűrű alakú struktúrát vesz fel a szeptum körüli régióban, ugyanúgy, mint a megfelelője a *Sch. pombe*-ben. Ez megerősíti a feltételezést, hogy a Mid2p^{Si} részt vesz a sejtseparációban és feltételezhetően hasonló szerepe lehet, mint a Mid2p-nek a *Sch. pombe*-ben [Berlin és mtsai, 2003; Tasto és mtsai, 2003], azaz a szeptum körüli régióban a szeptinokkal együtt gyűrűt alkotva segíti az Agn1p^{Si} és Eng1p^{Si} enzimek megfelelő helyre kerülését.

1. Introduction and aims

Schizosaccharomyces japonicus var. *japonicus* (later *Sch. japonicus*) is a fission yeast, which belongs to the Schizosaccharomycetales order, and its CBS 354 strain was isolated from strawberry wine [Yukava and Maki, 1931]. It has haploid genetic material, as the related, in the classical and molecular genetics preferred *Sch. pombe*, which allows the manifestation of the recessive mutations phenotypically. In contrast to *Sch. pombe*, the life cycle of *Sch. japonicus* is dimorphic, which means that it can switch from unicellular yeast-type to multicellular hyphal growth after 8-10 days of incubation on solid medium [Sipiczki et al, 1998]. *Sch. japonicus* is not pathogenic, although in some species, for example in *Ustilago maydis* (plant pathogen) [Bölker, 2001], *Candida albicans* and *Histoplasma capsulatum* (human pathogens) the dimorphism is a virulence factor [Eisenberg et al, 1996; Gow & Gooday 1987]. In spite of not being a virulence factor, the investigation of the *Sch. japonicus* dimorphism could help us better understand the mechanism of virulence of the pathogenic dimorphic fungi, which then may enable medical mycologists to find new anti-fungal therapies. Largely due to these features, it recently became a promising model organism in molecular biology [Rhind et al, 2011]. Its genome was completely sequenced (the genome sequence is available on the webpage of Broad Institute). The availability of its genome sequence allows cloning and examining of its genes.

In the Department of Genetics and Applied Microbiology at the University of Debrecen there is a tradition of the research of the yeast cell cycle. The last step of the cell cycle is the cytokinesis. I joined the investigation of this topic. During the cytokinesis in the *Sch. pombe* cell, a septum is made first then the daughter cells separate by the breakdown of the primary septum. The mature septum has a three layered structure composed of the inner primary septum and the flanking secondary septa.[Johnson et al, 1973]. The genes and the encoded proteins which take part in the cell separation of *Sch. pombe* and their regulation have been examined intensively and are known in details. In this process the proteins act in a cascade which has two main transcription factors: Sep1p and Ace2p [Sipiczki et al, 1993; Martin-Cuadrado et al, 2003]. The first described cell separation gene was *sep1⁺* [Sipiczki et al, 1993]. It encodes a transcription factor which plays role in other processes as well [Rustici et al, 2004]. The Sep1p protein contains a fork-head-type DNA binding domain and its transcript level shows no periodicity during the cell cycle, so it might be regulated by a post-transcriptional mechanism [Zilahi et al, 2000]. The *sep1Δ* cells are unable to separate from each other, and thus show hyphal-like growth [Sipiczki et al, 1993]. The *ace2Δ* cells form hyphae indistinguishable from those of *sep1Δ* and the overexpression of *ace2⁺* rescues the *sep1Δ* phenotype [Martin-Cuadrado et al, 2003], indicating that the Sep1p protein controls cell separation through *ace2⁺*. The *ace2⁺* gene encodes a zinc-finger transcription factor [Martin-Cuadrado et al, 2003]. Ace2p is posttranslationally modified by phosphorylation and Cdc2p cell cycle protein might have a role in its regulation [Petit et al, 2005]. The Sep1p-Ace2p transcription factors target many genes, among others those which encode proteins for septum cleavage (Eng1p, Agn1p) and Mid2p. The *eng1⁺* gene encodes an endo-β-1,3 glucanase which degrades the primary septum. The *agn1⁺* gene encodes an 1,3-α-glucanase which takes part in the erosion of the cell wall around the edge of the primary septum [Martin-Cuadrado et al, 2003; Dekker et al, 2004; Garcia et al, 2005]. The Mid2p protein, also regulated by Ace2p, is an anillin homologue, which helps the exocytosis of Agn1p and Eng1p by organizing the assembly of the septin ring [Berlin et al, 2003; Tasto et al, 2003].

The genes encoding the homologous proteins of the above mentioned Sep1p, Ace2p, Agn1p, Eng1p, Mid2p are present in the genome sequence of *Sch. japonicus*

but their roles were not known yet at the time of launching this project. As *Sch. japonicus* is a dimorphic organism, it would be also important to know more about the regulation of the activity of these cell separation genes during the transitions between the yeast and hyphal growth phases.

Based on these considerations we carried out the following research:

1. The characterisation of the above-mentioned genes and proteins in *Sch. japonicus*: creating mutant strains defective in these genes and investigation of their phenotypes.
2. Examination of the hypha formation, and fragmentation in the mutant strains (the roles of the genes in the switching between yeast and hypha phases).
3. Comparing the functions of these homologous proteins in the two species by testing if the proteins produced by the *Sch. japonicus* genes can complement the *Sch. pombe* deletion mutations (examination of functional homology).
4. Investigation of the function of *Sch. japonicus* cell separation genes:
 - a Effect of the inactivation of *sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}* genes on function of other cell separation genes.
 - b Expressing GFP (green fluorescens protein) tagged *Sch. japonicus* proteins (*Agn1p^{Sj}*, *Eng1p^{Sj}*, *Mid2p^{Sj}*) and localizing them within the cell.

2. New scientific results

2.1. Inactivation of the putative cell separation genes of *Sch. japonicus* and the investigation of the mutant phenotype

As a result of our work, the genes, which probably have roles in the cell separation of the *Sch. japonicus* (*sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}*, *eng1^{Sj}*, *agn1^{Sj}*, *mid2^{Sj}*) were identified with bioinformatics methods and were successfully inactivated. In the case of the *sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}*, *eng1^{Sj}* genes the *Sch. pombe ura4⁺* cassette was used for partial gene disruption.

The *Sch. pombe ura4⁺* gene can complement the mutant phenotype of the *Sch. japonicus ura4⁺* strain [Furuya és Niki, 2009], so this strain was used for gene inactivation. The *agn1^{Sj}* and *mid2^{Sj}* genes were completely deleted with a kanamycin-

resistance cassette, demonstrating that this method can be used in *Sch. japonicus* also.

The phenotypes of the mutants were investigated and found to be similar to the phenotypes of the *Sch. pombe* mutants defective in the homologous genes. The wild type *Sch. japonicus* cells are cylindrical (**Figure 1/A**), contain one nucleus (**Figure 1/C**) and don't contain septa, or only those cells have single ones, which are dividing (**Figure 1/B**). The phenotypes of the mutant *sep1^{Sj}* (**Figure 1/D-F**), *ace2^{Sj}* (**Figure 1/E-I**) and *agn1^{Sj}* (**Figure 2/D-F**) strains were filamentous in the yeast phase; cell chains were formed which contained numerous septa. The effect of the mutations of *eng1^{Sj}* and *mid2^{Sj}* is less obvious like in the case of the mutations of the *Sch. pombe* homologous genes. Based on these data we suppose that these *Sch. japonicus* genes have similar roles as their homologues in *Sch. pombe*: they contribute to the cell separation. The *agn1^{Sj}* gene seems to have a more important role in the *Sch. japonicus* (**Figure 2/D-F**) than in the *Sch. pombe* cells (**Figure 2/A-C**) because its mutant phenotype (**Figure 2/D-F**) is very similar to the mutant phenotype of the regulator genes (*sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}*). The *Sch. pombe agn1⁻* mutant cells have only a mild cell separation defect.

2.2. The phenotypes of the cell separation mutants in the mycelial phase

Sch. japonicus forms unipolarly growing hyphae on solid medium after incubation lasting 8-10 days [Sipiczki et al, 1998]. The formation of hyphae is triggered by nitrogen starvation. The hyphae grow always towards the part of the medium which is richer in nutrients. After adding nitrogen source to the growing edge of the mycelium the hyphae stop growing, undergo fragmentation and return to the yeast phase in which then divide bipolarly again [Sipiczki et al, 1998]. The formation and fragmentation of hyphae in the *Sch. japonicus* mutant strains were examined. The results are very similar in all strains, so we show the hypha formation and fragmentation of one mutant strain (defective in *sep1^{Sj}*) only.

The hyphae of the *Sch. japonicus sep1^{Sj}::ura4⁺* (7-254) mutant (**Figure 4/A**) grew essentially like the hyphae of the wild type (7-1) strain (**Figure 3/A**); they branched always under the septum to produce new hyphae. So the inactivation of the *sep1^{Sj}* gene has no effect on the yeast to hypha transition and hyphal growing. Then the fragmentation of the *sep1^{Sj}* hyphae occurred. The *sep1^{Sj}::ura4⁺* mutant (7-254)

formed septa in its hyphae after addition of nitrogen source to the medium as the wild type did (**Figure 3/B**). However, while the wild type hyphae became fragmented totally (**Figure 3/C, D**), the *sep1^{Sj}* mutant could not cleave its septa. In spite of the absence of fragmentation, the cells returned to the bipolar growth, which is characteristic in the yeast phase. The cells (non-separated hyphal fragments) grew on both sides of the septa, producing lateral extensions (**Figure 4/C és D**, marked with red arrows), which never occurs in the unipolarly growing hyphae [Sipiczki et al. 1998]. Due to the mechanical tensions between the growing cells ends, septum splitting can occur at certain septa, so the mutant hypha can also break at some sites (**Figure 4/E, F**).

In the mutants defective in *ace2^{Sj}*, *eng1^{Sj}*, *agn1^{Sj}* or *mid2^{Sj}* the hyphae also have difficulties with the dissolution of their septa. The mutant phenotypes indicate that these genes have no roles in the mycelial growth, but are involved in the hypha to yeast transition.

2.3. Expression of the cell separation genes in the related *Sch. pombe*

The *sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}* *agn1^{Sj}* and *eng1^{Sj}* expression was examined in the related *Sch. pombe* with constructs integrated into the pREP vector series.

The middle and low expression of the *Sch. japonicus sep1^{Sj}* and *ace2^{Sj}* in the *Sch. pombe sep1⁻* and *ace2⁻* mutants reduced the number of cells with multiple septa, and increased the proportion of single cells.

The *Sch. japonicus agn1^{Sj}* gene expression in the *Sch. pombe agn1⁻* mutant decreased the number of the cells with septa and the undivided sister cells.

Eng1p is not essential during the cell division, so it is difficult to examine the complementation effect of the *Sch. japonicus* gene in *Sch. pombe* mutant cells. The difference between the wild type and *eng1⁻* mutant is in the timing of the dissolution of the primary septum, which was investigated with microscopical time-lapse analysis. The *Sch. pombe eng1⁻* mutant transformed with the *Sch. japonicus eng1^{Sj}* gene, dissolved the septum more slowly than the wild type but faster than the non-transformed *eng1⁻* mutant.

In summary, we found that all these genes could partially complement the phenotypes of the *Sch. pombe* mutants defective in the homologue genes. So besides

the sequence similarity, there is also functional interchangeability between the cell separation genes of the two related species.

2.4. The effect of the inactivation of the *sep1^{Sj}*, *ace2^{Sj}* genes on the activity of other cell separation genes

In the *Sch. japonicus* mutant strains defective in *sep1^{Sj}* or *ace2^{Sj}* the mRNA levels of the target genes were measured with qPCR. It was found that except for *cfh4^{Sj}*, the mRNA levels of all the examined genes (*agn1^{Sj}*, *eng1^{Sj}*, *mid2^{Sj}*, *adg1^{Sj}*) decreased in both *Sch. japonicus* mutant strains (see the case of *sep1^{Sj}* mutant in **Figure 5**, the *ace2^{Sj}* mutant showed similar results) compared with the mRNA levels of these genes in the wild type (which is considered as 1 value). So we suppose that the Sep1p^{Sj} and Ace2p^{Sj} proteins regulate the transcription level of *agn1^{Sj}*, *eng1^{Sj}*, *mid2^{Sj}*, and *adg1^{Sj}* genes in *Sch. japonicus* like their counterparts regulate the homologues target genes of *Sch. pombe*. In the *sep1^{Sj}* mutant the mRNA level of the *ace2^{Sj}* gene was low, so the *ace2^{Sj}* gene itself is under the regulation of *sep1^{Sj}*, as in *Sch. pombe* [Martin-Cuadrado et al, 2003]. The mRNA level of *cfh4^{Sj}* is not influenced by the Sep1p^{Sj} and Ace2p^{Sj} transcription factors in *Sch. japonicus*.

2.5. Investigation of localisation of the products of the *eng1^{Sj}*, *agn1^{Sj}* and *mid2^{Sj}* genes

The Eng1p^{Sj}, Agn1p^{Sj} and Mid2p^{Sj} proteins were tagged with GFP, and the localization of the tagged proteins within the cells was examined with fluorescence microscopy. The exact localisation of Agn1p^{Sj}-GFP and Eng1p^{Sj}-GFP proteins could not be determined because of technical problems. These fluorescent proteins could not leave the endoplasmatic reticulum because the GFP-tag probably disturbed the normal folding of the proteins. Further experiments are necessary to resolve this question. The Mid2p^{Sj}-GFP protein was observed in the septal region of the cell, where it formed a ring-like structure (**Figure 6**). Based on this, Mid2p^{Sj} has probably a similar function in *Sch. japonicus* as its counterpart in *Sch. pombe* [Berlin et al, 2003; Tasto et al 2003]: it forms a ring with the septin proteins, and helps the correct localisation of the Agn1p^{Sj} and Eng1p^{Sj} enzymes.

3. Irodalomjegyzék/References

- Berlin A, Paoletti A. & Chang F.** (2003) Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J Cell Biol* **160**:1083-1092.
- Broad Institute webpage:** [http:// www.broadinstitute.org /annotation /genome/schizosaccharomyces_group/ GenomeDescriptions.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/GenomeDescriptions.html)'.
- Bölker M.** (2001) *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiol UK* **147**:1395-401.
- Dekker N, de Haan A. & Hochstenbach F.** (2006) Transcription regulation of the alpha-glucanase gene *agn1* by cell separation transcription factor Ace2p in fission yeast. *FEBS Lett* **580**:3099-3106.
- Eissenberg L.G, Poirier S. & Goldman W.E.** (1996) Phenotypic variation and persistence of *Histoplasma capsulatum* yeasts in host cells. *Infect Immun* **64**:5310-5314.
- Furuya K. & Niki H.** (2009) Isolation of heterothallic haploid and auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces japonicus*. *Yeast* **26**:221-233.
- García I, Jiménez D, Martín V, Durán A. & Sánchez Y.** (2005) The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* **97**:569-576.
- Gow N.A. & Gooday G.W.** (1987) Cytological aspects of dimorphism in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* **15**:73-78.
- Johnson B.F, Yoo B.Y. & Calleja G.B.** (1973) Cell division in yeasts: movement of organelles associated with cell plate growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **115**:358-366.
- Martín-Cuadrado A. B, Dueñas E, Sipiczki M, de Aldana C. R. V. & del Rey F.** (2003) The endo-beta-1,3-glucanase Eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**:1689-1698.
- Petit C. S, Mehta S, Roberts R. H. & Gould K. L.** (2005) Ace2p contributes to fission yeast septin ring assembly by regulating *mid2*⁺ expression. *J Cell Sci* **118**: 5731-5742.
- Rhind N, Chen Z, Yassour M, Thompson D.A, Haas B.J, Habib N, Wapinski I, Roy S, Lin M.F, Heiman D, Young SK, Furuya K, Guo Y, Pidoux A, Chen H.M,**

Robbertse B, Goldberg J.M, Aoki K, Bayne E.H, Berlin A.M, Desjardins C.A, Dobbs E, Dukaj L, Fan L, FitzGerald M.G, French C, Gujja S, Hansen K, Keifenheim D, Levin J.Z, Mosher R.A, Müller C.A, Pfiffner J, Priest M, Russ C, Smialowska A, Swoboda P, Sykes S.M, Vaughn M, Vengrova S, Yoder R, Zeng Q, Allshire R, Baulcombe D, Birren B.W, Brown W, Ekwall K, Kellis M, Leatherwood J, Levin H, Margalit H, Martienssen R, Nieduszynski C.A, Spatafora J.W, Friedman N, Dalgaard J.Z, Baumann P, Niki H, Regev A & Nusbaum C. (2011) Comparative functional genomics of fission yeast. *Science* **332**:930-936

Rustici G, Mata J, Kivinen K, Lió P, Penkett C. J, Burns G, Hayles J, Brazma A, Nurse P. & Bähler J. (2004) Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* **36**:809-817.

Sipiczki M, Grallert B. & Miklos I. (1993) Mycelial and syncytial growth in *Schizosaccharomyces pombe* induced by novel septation mutations. *J Cell Sci* **104**:485-493.

Sipiczki M, Takeo K. & Grallert A. (1998) Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiol UK* **144**:3475-3485.

Sipiczki M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S. & Miklos I. (1998) Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiol UK* **144**: 1319-1330.

Tasto J. J, Morrell J. L. & Gould K. L. (2003) An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol* **160**: 1093-1103.

Yukawa M. & Maki T. (1931) *Schizosaccharomyces japonicus* nov. spec. *La Bul. Sci. Falkultato Terkultura*, Kjusu Imp. Univ, Fukuoka, Japan, 4, pp. 218–226.

Zilahi E, Salimova E, Simanis V. & Sipiczki M. (2000) The *Sch. pombe sep1* gene encodes a nuclear protein that is required for periodic expression of the *cdc15* gene. *FEBS Lett* **481**:105-108.

4. Publikációs jegyzék/Publication list

4.1. Cikkek/Articles

4.1.1. A doktori témájában íródott cikk/ Article on the topic of Ph.D. thesis

Balazs A, Batta G, Acs-Szabo L, Vázquez de Aldana C.R, Miklos I, Sipiczki M. (2012) Conserved regulators of the cell separation process in *Schizosaccharomyces*. *Fung Gen Biol* (in press); Impact factor: 3.333 (2010); ISSN: 1087-1845

4.1.2. Egyéb cikk/ Other article

Balázs A, Pócsi I, Hamari Z, Leiter E, Emri T, Miskei M, Oláh J, Tóth V, Pócsi I, Hegedus N, Prade RA, Molnár M and Pócsi I (2010) AtfA bZip-type transcription factor regulates osmotic and oxidative stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Genet. Genomics* **283**(3):289-303; Impact factor: 2.453 (2010), Citation: 6; ISSN: 1617-4615

4.2. Konferencia előadások és poszterek/Lectures and posters at conferences

Balázs A, Leiter É, Pócsi I; A *Penicillium chrysogenum* fonalas gomba által termelt kis móltömegű antifungális fehérje (PAF) hatásának vizsgálata jelátviteli útvonalban sérült *Aspergillus nidulans* mutánsokon; XXVIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencián III. helyezés Mikrobiológia II. tagozatban; 2007. április 4-6./Investigation of the small antifungal protein (PAF) on *Aspergillus nidulans* mutants which are defective in signal transduction pathways; XXVIIIth National Conference of Scientific Students' Associations; Microbiology II section; III rank; 4-6 April 2007

Balázs A, Molnár M, Pócsi I; The complementation of *atf1* deletion mutant *Schizosaccharomyces pombe* with the *atfA* cDNA of *Aspergillus nidulans*; Central European Summer Course; Szeged; Biology of pathogenic *Candida* species: genetics, genomics, diagnostics; Abstract book p. 41; 30th June- 4th July 2008

Balázs A, Molnár M, Pócsi I (2008) Complementation of the *atf1* deletion mutant of *Schizosaccharomyces pombe* with the *atfA* cDNA of *Aspergillus nidulans*; Abstracts of the Fourth Hungarian Conference of Mycology; Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica; Volume 55; Number 2, p: 173

Balázs A, Miklós I, Madar M, Batta G, Ács-Szabó L, Mónus A, Vazquez de Aldana C. R, Sipiczki M; Investigation of genes playing roles in the cell separation of *Schizosaccharomyces japonicus*; 38th Annual Conference on Yeasts Smolenice; Slovakia; 11-14 May 2010

Madar A, **Balázs A**, Banyai G, Batta G, Gyuricza K, Miklos I, Sipiczki M; Interspecific complementation of mutations in genes coding for regulators of cell separation in *Sch. pombe*; The 5th International Fission Yeast Meeting; Tokyo, Japan; Abstract Book p. 277, 2009

Balázs A, Langmár-Nagy R, Madar A, Mónus A, Miklós I, Sipiczki M; A sejtszeparációs kaszkád evolúciója gombáknál; IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI: Sejt és Fejlődésbiológiai Napok; program összefoglaló: 48. oldal; Siófok 2011. március 25-27. /Evolution of the cell separation cascade in fungi; IXth Hungarian Congress of Genetics and XVIth Cell and Developmental Biology Days; abstract book p: 48; Siófok; Hungary; 25-27th March 2011