

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei
Thesis of PhD dissertation

A dimorfizmus genetikai hátterének vizsgálata
***Schizosaccharomyces japonicus*-ban**

Investigation of the genetic background of
dimorphism in *Schizosaccharomyces japonicus*

Papp László Attila

Témavezető/Supervisor: Gálné Dr. Miklós Ida
Tanszékvezető, egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2015

I. Bevezetés és célkitűzés

Számos gomba képes növényeket, állatokat, és embereket fertőzni, mások pedig szaprofita módon a talajban élnek és az ottani szerves anyagokat használják az életfolyamataik fenntartásához. Azon fajok, melyek dimorfizmussal rendelkeznek, jobban terjeszkedhetnek, adaptálódhatnak, vagy élhetnek olyan speciális körülmények között, melyek más, egysejtes rokonaik számára végzetesnek bizonyulnának. A dimorf patogén gombák között vannak olyanok, melyek a mezőgazdaságban súlyos károkat okoznak azzal, hogy a gazdanövényt elpusztítják, vagy fogyasztásképtelenné teszik a terményt. Ilyen például a kukorica veszedelmes, mikroszkopikus kártevője az *Ustilago maydis*, mely a növényi szövetek burjánzását idézi elő (Gao, 2013). A *Fusarium* genusz tagjai szintén nagy károkat okoznak a mezőgazdaságnak, melyek között vannak olyan fajok, melyek toxinokat termelnek, és ezek a terményekkel bekerülhetnek az emberi és állati szervezetekbe (Sobrova és mtsai, 2010)

A *Cryptococcus neoformans* tüdőgyulladás-szerű megbetegedést és meningitist okoz olyan emberekben, akiknek valamilyen ok folytán gyengébb az immunrendszere. A patogén gombáknál említést kell tenni a *Candida albicans*-ról, mely normál esetben, egy a bélben előforduló

mikroorganizmus, a bélflóra alkotója. Az immunrendszer gyengülése következtében viszont súlyos megbetegedéseket, akár halált is okozhatnak (Pfaller és mtsai, 2006; Mayer és mtsai, 2013).

E dimorf gombák tanulmányozása sokszor nehézkes, hiszen speciális körülményeket igényelnek, ha pedig diploidok, mint például a *C. albicans*, akkor a génjei deletálása, molekuláris genetikai manipulációja nem egyszerű. Emellett előfordul az is, hogy a genomjuk még nem annotált. Problémát jelent a patogenitásuk is, amely miatt a munka fokozott elővigyázatot igényel.

A dimorfizmus genetikai háttere bioinformatikai és kísérletes adatok alapján nagyfokú konzerváltságot mutat a gombák világában, ebből kifolyólag a nem patogén, de dimorfizmust mutató organizmusok is kiváló modellszervezetek lehetnek, melyek segíthetnek e tulajdonság hátterében meghúzódó molekuláris folyamatok részletesebb megismerésében. A különböző fajokban kapott eredmények összehasonlítása pedig rávilágíthat a morfológiai átváltás fajspecifikus elemeire is.

Éppen ezért a tanszékünkön a *Schizosaccharomyces japonicus* hasadó élesztővel kezdtünk el dolgozni, mely a gombák egy különleges, evolúciós szempontból korán leágazó csoportjába tartozik. Ez a faj a *Schizosaccharomycetales* genusz

filogenetikailag legidősebb tagja, mely megőrizte a valamikori közös ős dimorfizmusra való képességét (Sipiczki, 1995). Ráadásul haploid, így a génmanipulációk következményei azonnal megnyilvánulnak és könnyen tanulmányozhatók.

A munka során így a célunk a dimorfizmus folyamatának és genetikai hátterének a megismerése volt a *Sch. japonicus* modellszervezetben, melynek részletei az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1) Klasszikus genetikai és mikrobiológiai kísérletekkel tovább akartuk vizsgálni a környezeti körülmények élesztő-hifa átalakulásra való hatását.

2) Másrészt pedig célunk volt, a dimorfizmus molekuláris hátterének vizsgálata.

a) a dimorfizmushoz köthető gének és szignál-transzdukciós útvonalak azonosítása.

b) ennek megvalósítása érdekében egy dimorfizmusban szerepet játszó regulátor gén deléciónja.

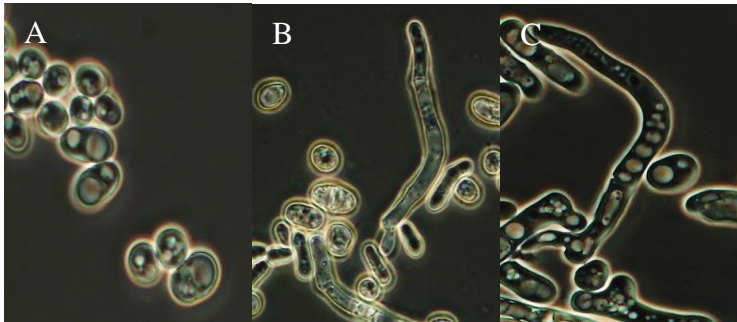
c) az így létrehozott mutáns segítségével egy lehetséges jelátviteli útvonal elkészítése.

3) Célunk volt továbbá, hogy a klasszikus és molekuláris vizsgálatok eredményeit összehasonlítva más fajok eredményeivel, azonosítsuk a dimorfizmus fajtól független, evolúciósan konzervatív és faj specifikus résztvevőit.

II. Új tudományos eredmények

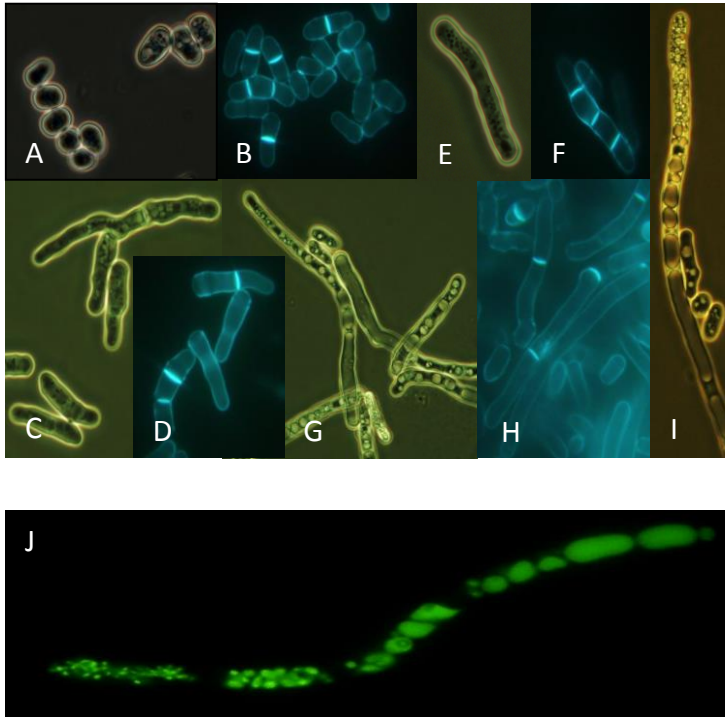
II.1 Hifaképzés indukciója folyékony tápközegben

Előzetes kutatások azt mutatták, hogy a *Sch. japonicus* hifaképzése szilárd táptalajt igényel (Sipiczki, 1998). A mi kísérleti eredményeink ellenben azt mutatták, hogy a minimál tápfolyadék, 1M-os szorbitol (1. ábra B, C), valamint magzati vészérum (FBS) hatására e faj is képes hifát képezni. (1. és 2. ábrák) Mindezek mellett azt tapasztaltuk, hogy a FBS indukáló hatását savas pH-n csökkenteni valamint képesek voltunk a szérum hatását teljesen eliminálni (3. és 4. ábrák).



1. ábra Minimál körülmények és ozmotikus stressz hatása 7-1 törzs hifaképzésére. **A)** YPL, **B)** EMM1 minimál tápfolyadék **C)** YPL+1M sorbitol, 37°C, 1 nap inkubáció után. Az ábrákat Olympus BX40 mikroszkóppal és 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

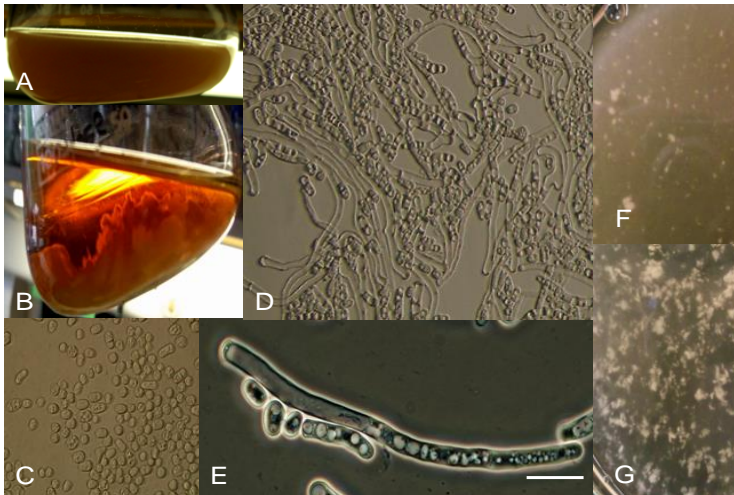
Figure 1 Effect of minimal conditions and osmotic stress on the hyphal growth of 7-1 strain. **A)** YPL, **B)** EMMML minimal media, **C)** YPL+1M sorbitol. The cells were cultured for 1 day at 37°C. These figures captured by 100x magnification objective with Olympus BX40 microscope.



2. ábra A *Sch.japonicus* sejtek morfológiája YPL+ 10% FBS tápfolyadékban. (rázatás nélkül) **A-B)** 7-1 kontroll YPL 25-30 és 37°C-on. **C-D)** YPL+FBS 25°C-on. **E-F)** YPL+FBS 30°C-on. **G-I)** YPL+FBS 37°C-on. **B,D,F,H)** szeptum festés

calcofluorral. **J**) vakuólum festés Bar:10 μ m. Az ábrákat Olympus BX40 mikroszkóppal és 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

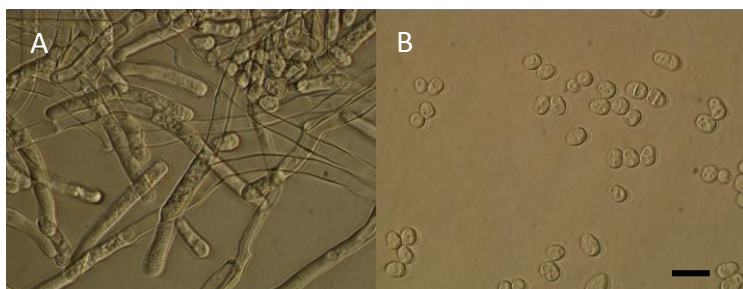
Figure 2 Cell morphology of *Sch. japonicus* in YPL+ 10% FBS liquid media. (without shaking) **A-B**) 7-1 control in YPL at 25-30 and 37°C. **C-D**) YPL+FBS at 25°C. **E-F**) YPL+FBS at 30°C. **G-I**) YPL+FBS at 37°C. **B,D,F,H**) calcofluor staining of septa **J**) fluorescent vacuolar staining. Bar: 10 μ m. These figures captured by 100x magnification objective with Olympus BX40 microscope.



3. ábra A *Sch.japonicus* sejtek 50%-os FBS- szérumban. **A)** YPL kontroll. **B)** YPL + 50% FBS szérumban okozta flokkuláció. **C)** Sejtmorfológia YPL-ben. **D-E)** Az 50%-os szérumban hatása a

sejtmorfológiára. **F)** összecsapzódás YPL + 50% FBS tápfolyadékban pH5,5-n **G)** összecsapzódás YPL + 50% FBS tápfolyadékban pH:6,7-n. **C)** és **D)** Nomarski felvétel. Skála: 10 μm . A mikroszkópos ábrákat Olympus BX40 mikroszkóppal és 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

Figure 3 *Sch. japonicus* cells in FBS+50% serum. **A)** YPL control. **B)** flocculation in YPL+50% FBS. **C)** cell morphology in YPL. **D-E)** The effect of 50% serum to the cell morphology. **F)** Flocculation in YPL + 50% FBS media at pH5,5. **G)** Flocculation in YPL + 50% FBS media at pH6,7. **C)** and **D)** Normarski record. Sclae: 10 μm . These figures captured by 100x magnification objective with Olympus BX40 microscope.



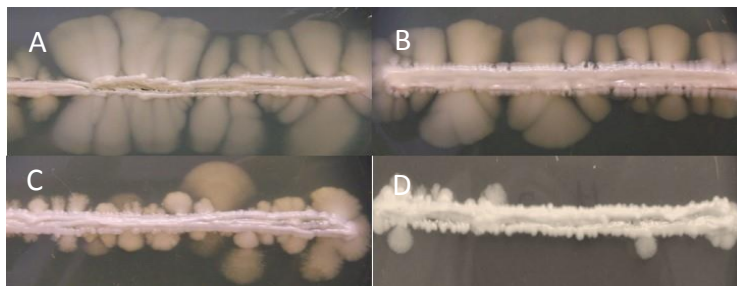
4. ábra Sejtmorfológia vizsgálata a hőkezelt FBS tartalmú tápfolyadékban. **A)** YPL+10% FBS szérum **B)** forráspontig hevített YPL+10% FBS. Skála: 10 μm . A mikroszkópos ábrákat Olympus BX40 mikroszkóppal és 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

Figure 4 Cell morphology in the heated FBS containing medium. **A)** YPL+10% FBS serum. **B)** heat treated YPL+10% FBS. Scale: 10 μ m. These figures captured by 100x magnification objective with Olympus BX40 microscope.

II.2 Dimorfizmust befolyásoló külső környezeti körülmények hatásának vizsgálata

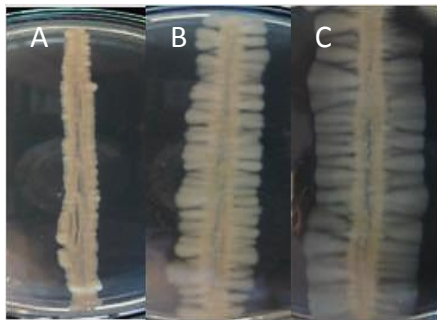
Munkánk során megvizsgáltuk, hogy különböző környezeti körülmény miként befolyásolja a *Sch. japonicus* dimorfizmusát. Találtunk indukáló és gátló és faktorokat.

Indukáló hatást tapasztaltunk alacsony pH-n (5. ábra A), 37°C-os hőmérsékleten (6. ábra C), és pepton jelenlétében (7. ábra C).



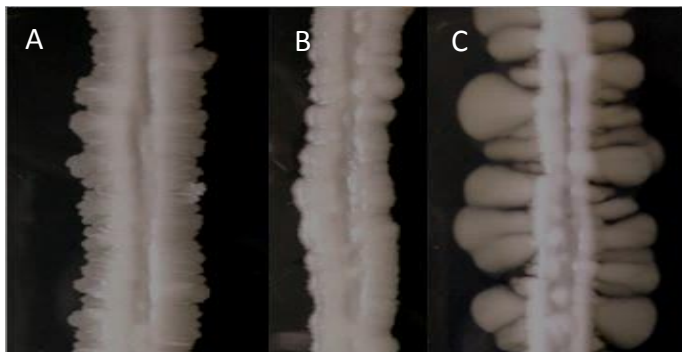
5. ábra 7-1-es törzs morfológiai átváltásának vizsgálata különböző pH-val rendelkező YPA táptalajon. (inkubálás 30°C-on 7 napig) **A)** pH4; **B)** pH5; **C)** pH7; **D)** pH8

Figure 5 Study of morphological switch (7-1 strain) at different pH media. **A)** pH4; **B)** pH5; **C)** pH7; **D)** pH8



6. ábra A hőmérséklet hatása a 7-1 törzs morfológia átváltására. **A)** 25°C; **B)** 30°C; **C)** 37°C, a csészék 7 napig inkubálódtak.

Figure 6 The effect of temperature on the morphological switch of 7-1 strain. **A)** 25°C; **B)** 30°C; **C)** 37°C



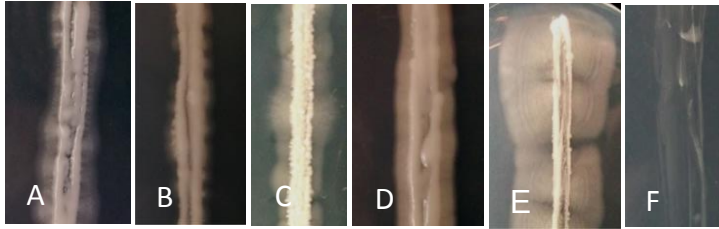
7. ábra A pepton hatásának vizsgálata. **A)** YEA 3%(m/m) glükóz, **B)** YEA 2%(m/m) glükóz, **C)** YPA (2%(m/m) glükóz+ 1% pepton), 7-1 törzs, 30°C-on inkubálva 7 napig. (A

különböző pH-val rendelkező táptalajokon és a különböző hőmérsékleteken hasonló eredményt kaptunk)

Figure 7 The effect of peptone. **A)** YEA 3%(m/m) glucose, **B)** YEA 2%(m/m) glucose, **C)** YPA 2%(m/m) glucose + 1% peptone.

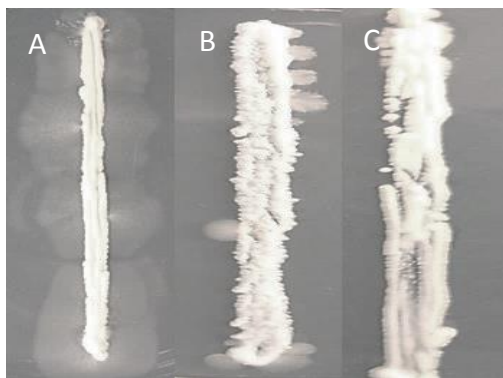
Mivel az eddig elvégzett kísérletek mind olyan táptalajon készültek, melyeknek nem ismerjük a pontos kompozícióját, ezért szeretnénk volna meghatározni, hogy e faktorok közül melyik (melyek) felel az indukáló hatásért. Ennek felderítésére olyan minimál táptalajokat (EMMA) készítettünk, melyek nitrogén forrását lecseréltük az általunk választott aminosavakra. Azt tapasztaltuk, hogy a *Sch. japonicus* képes nitrogén forrásként hasznosítani a megvizsgált aminosavakat kivéve a prolint, mindezek mellett az arginin és a metionin még elő is segítik a fonalas növekedést. (8. ábra)

Gátló hatást tapasztaltunk pH8-on valamint 0,5mg/ml adenin és 1mg/ml guanin nukleobázis jelenlétében. (9. ábra)



8. ábra *Sch.japonicus* sejtek szaporodása és hifaképzése N-forrás nélküli (NH_4Cl), 10mM aminosavval kiegészített minimál táptalajon (EMMA). **A)** EMMA + NH_4Cl , **B)** EMMA-N+leucin, **C)** EMMA-N+izoleucin, **D)** EMMA-N+metionin **E)** EMMA-N+arginin, **F)** EMMA-N+prolin

Figure 8 Mycelial growth on minimal media without N-source (NH_4Cl) supplemented with 10mM amino acids. **A)** EMMA + NH_4Cl , **B)** EMMA-N+leucine, **C)** EMMA-N+isoleucine, **D)** EMMA-N+methionine, **E)** EMMA-N+arginine, **F)** EMMA-N+proline



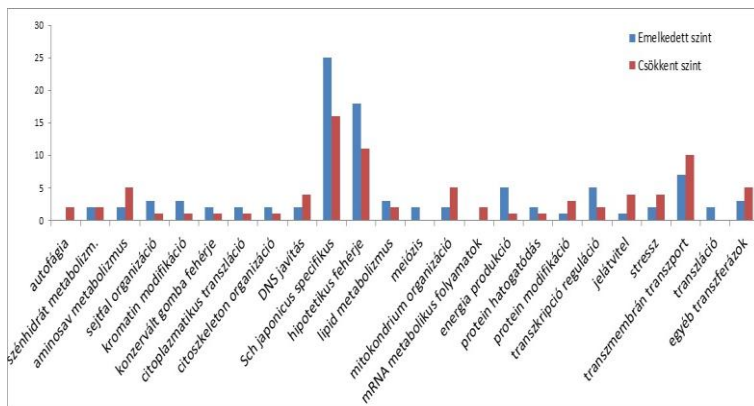
9. ábra Az adenin és guanin hatása a 7-1 törzs élesztő-hifa átváltásra. **A)** EMMA kontroll **B)** EMMA + 0,5 mg/ml adenin, **C)** EMMA + 1mg/ml guanin

Figure 9 The effect of adenine and guanine on the hyphal growth of 7-1 strain. **A)** EMMA control, **B)** EMMA + 0,5 mg/ml adenine, **C)** EMMA + 1mg/ml guanine

II.3 RNS szekvenálás hifás állapotú *Sch. japonicus*-ból.

Hifás állapotú *Sch. japonicus* sejtekből totál RNS-t izoláltunk majd ezt szekvenáltattuk. Ennek alapján megállapítottuk, hogy az élesztő állapotú sejtekhez képest a hifákban 2903 gén szintje változott. Ezek közül 1366 gén emelkedett, míg 1537 gén csökkent szintet mutatott. Ezen génekből csak a $\log_2 +2$ és e feletti valamint a -2 és ez alatti

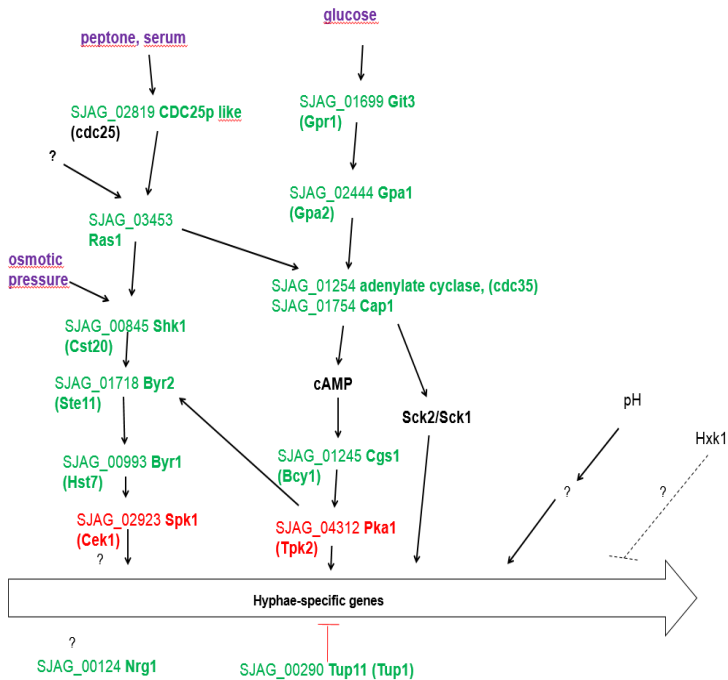
értékeket használtuk. A GO kategóriák alapján csoportosítottuk a géneket és e csoportokat ábrázoltuk grafikonon. (10. ábra)



10. ábra A dimorfizmusban feltehetően jelentős szerepet játszó gének funkciói és RNS szint változása. (X-tengely: funkciók, Y tengely: a gének száma)

Figure 10 Genes and their functions which are involved in dimorphism. (X-axis: functions; Y axis: number of genes)

Ezeket az eredményeket összehasonlítottuk a távoli rokon *C. albicans* adataival és azt tapasztaltuk, a dimorfizmus molekuláris útvonalai hasonló módon regulálódnak a *Sch. japonicusban*. (11. ábra)



11. ábra Az élesztő hifa átváltás feltételezett jelátvittele. Az ábra Biswas 2007-ben közölt *Candida albicans* szignalizációja alapján készült. Piros betűkkel az RNS szekvenálás adatok alapján csökkent expressziós szintű gének neve látható, míg zölddel az emelkedett génkifejeződés szint van jelölve. A zárójelben a *C. albicans* orthológjai láthatók (Biswas és mtsai, 2007).

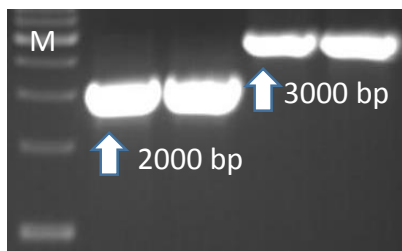
Figure 11 Putative signaling pathway of the yeast-hyphae switch. This figure is based on Biswas's publication in 2007.

Red letters indicate the reduced expression levels while green letters are the elevated expression levels. In brackets there are the orthologous genes of *C. albicans*. (Biswas et al, 2007)

A módosult transzkripció szintet mutató gének között számos regulátor gén is volt. Ezek közül a bioinformatikai összehasonlítások után a leghasonlóbb regulátor gént, a *pka1* gént választottuk ki, mely a protein kináz A enzim fehérjét kódolja és szakirodalmi adatok alapján fontos regulátora a dimorfizmusnak. (Fuller és Rhodes, 2012)

II.4 A *pka1* deléciós mutáns létrehozása *Sch. japonicus*-ban

A kromoszómáról felszaporított *pka1* gént klónozó vektorba (pJET1.2 blunt) ligáltuk, majd a gén kódoló régióját restrikciós emésztéssel eltávolítottuk, és helyére a KanMX6 szelekciós markert ligáltuk. Az így létrehozott deléciós konstrukciót integratívan transzformáltuk *Sch. japonicus*-ba. A homológ rekombinációs telepeket pedig PCR-rel ellenőriztük. (12. ábra)



12. ábra A *pka1* deléciós konstrukció integrációjának ellenőrzése. A sikeres integrációt a 2000 és 3000 bp-os sávok jelzik. M a méret markert jelzi.

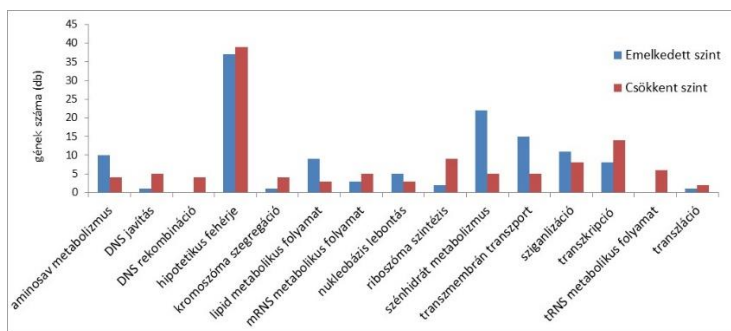
Figure 12 Check of the integration of *pka1* deletion construction. The successfully integrated construction are indicated by 2000 and 3000 bp bands respectively. M indicates the molecular marker.

II.5 RNS szekvenálás és fenotípusos vizsgálatok a *pka1*Δ mutáns törzssel.

Azt tapasztaltuk, hogy a *pka1* hiánya nem letális. Mivel a mutáns törzsünk pleiotróp fenotípust mutatott, ezért szeretnénk volna meghatározni a *pka1* gén által regulált géneket, azaz a mutáns sejt transzkripciós mintázatát. Azt tapasztaltuk, hogy 1986 gén szintje változott meg a mutáció miatt, ebből mi 366 génnek állapítottuk meg a funkcióját a GO kategóriák alapján, melyet ábrázoltunk grafikonon. (13. ábra) Az RNS szekvenálás során kapott gének egy részét sikerült fenotípusosan is

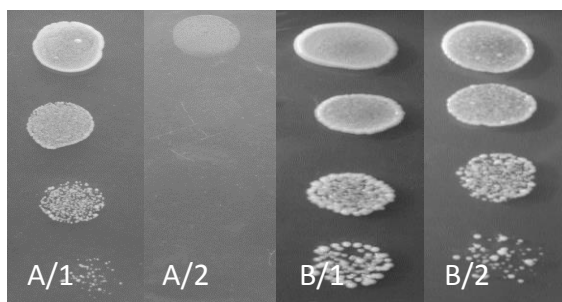
validálni. Azt tapasztaltuk, hogy a mutánsunk érzékenységet mutatott például különböző stressz faktorokra. (14,15,16. ábrák)

A szekvenálási és fenotípusos adatok alapján elkészítettük a *pka1* gén feltételezett szignalizációs útvonalát. (17. ábra)



13. ábra A *pka1* mutáns által regulált fontosabb folyamatok

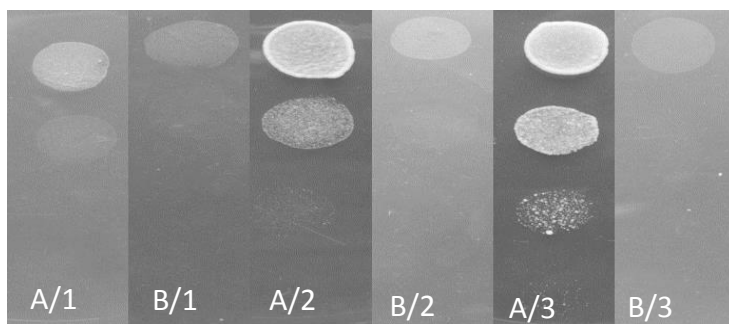
Figure 13 Important processes which are regulated by *pka1p*.



14. ábra KCl hatásának vizsgálata. 7-1 [A1/B1] és *pka1Δ* [A2/B2]. Az **A)** ábra 0,75M-os KCl-tartalmú YPA 37°C-on; **B)**

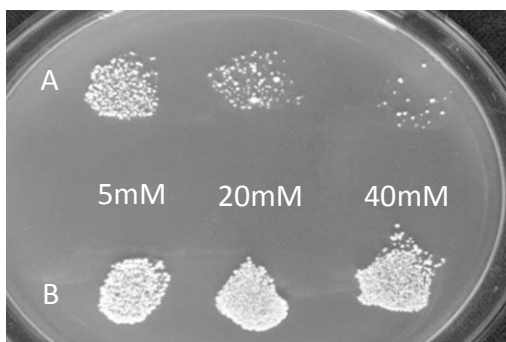
ábra YPA 37°C-on. A felső OD₅₉₅ = 0,2 sejtkoncentrációt tartalmazott, az alatta levő sorokban pedig 10x, 100x valamint, 1000x hígítás látható.

Figure 14 Examination of the effect of KCl. 7-1 [A1/B1] and *pka1*Δ [A2/B2] drops. The **A**) 0,75M KCl in YPA at 37°C; **B**) YPA control at 37°C. The top row contained OD₅₉₅= 0,2 cell concentration and the rows beneath contained dilutions 10x, 100x, 1000x.



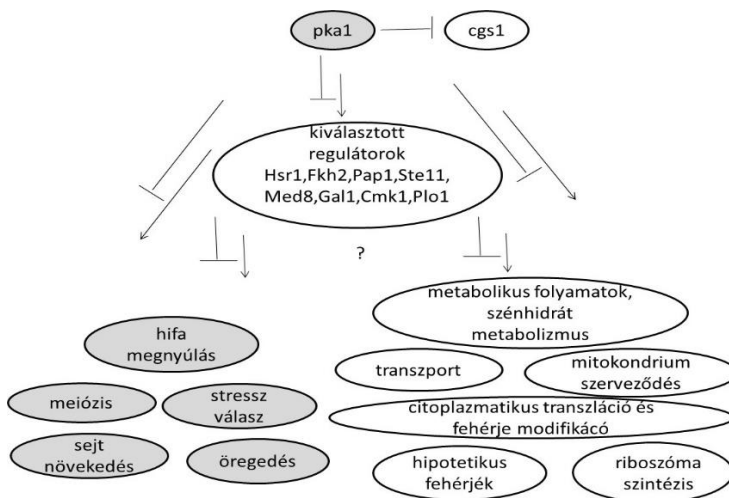
15. ábra 5mM koffein hatása a sejtek szaporodására. **A**) vad típusú sejtek, **B**) *pka1* mutáns sejtek. Az 1-3 számok a hőmérséklet emelkedését jelzik: 25, 30 és 37°C egyenként. A felső sor OD₅₉₅= 0,2 ezután 10x, 100x valamint, 1000x hígítás látható. A csészék 2 napig voltak inkubálva az említett hőmérsékleteken.

Figure 15 The effect of caffeine to the cell proliferation. **A)** wild type cells, **B)** *pka1* mutant cells. 1-3 numbers are indicate the elevation of temperature: 25, 30 and 37°C respectively. The top row OD₅₉₅= 0,2 cell concentration and the rows beneath contained dilutions 10x, 100x, 1000x.



16. ábra Hidrogén-peroxid hatásának vizsgálata. Az ábra felső sorában **(A)** a *pka1* mutáns sejtjei, az alsó sorban **(B)** a 7-1 vad típusú sejtek láthatók. Balról jobbra a stressz vizsgálat során alkalmazott hidrogén-peroxid koncentrációkat láthatjuk. A sejtek YPA csészén 30°C-on inkubálódtak 2 napig.

Figure 16 Examination the effect of hydrogen peroxide. **A)** *pka1* mutant cells, **B)** 7-1 wild type cells. From left to right are the applied concentrations of hydrogen peroxide. The cells were incubated for 2 days at 30°C.



17. ábra A *Sch.japonicus* PKA útvonal feltételezett szignalizációja és feltételezett célgénjei. A szürke körök a fenotípusos vizsgálattal is megerősített folyamatok, a fehér körök az RNS szekvenálási adatok alapján feltételezett folyamatok.

Figure 17 Predicted PKA signaling pathway. Spheres with grey are the phenotypically validated functions while spheres with white are predicted processes based on RNA sequencing.

III. Összefoglalás

Munkánk célja a dimorfizmus vizsgálata volt *Sch. japonicus* modellszervezetben. Ennek során a külső körülmények hatását, illetve a miceliális növekedés molekuláris hátterét tanulmányoztuk. Eredményünk az alábbiakban foglalható össze:

Meghatároztuk, hogy a *Sch. japonicus* – FBS valamint 1M-os szorbitol, és minimál tápfolyadék hatására - képes folyadékban is fonalas formában szaporodni. Ez új eredmény, hiszen a korábbi eredmények azt mutatták, hogy a környezeti hatások közül, főként a tápanyagok hiánya indukálhatja a fonalas növekedésbe való áttérést, illetve, hogy szilárd felszín szükséges a miceliális növekedéshez (Sipiczki és mtsai, 1998b). (1-4. ábrák) A folyadék táptalajban való fonalas növekedés nagyon hasznos lehet a dimorfizmus további molekuláris vizsgálatában.

Megállapítottuk, hogy a *Sch. japonicus* szilárd táptalajon, fonalas formába történő átváltása erősen függ a külső körülményektől. (5-9. ábrák) Sikeresen azonosítottuk a morfológiai átváltást elősegítő és gátló körülményeket.

Megállapítottuk, hogy e körülmények tekintetében csak részben hasonlít a *C. albicans*-ra.

Sikerült a hifás állapotú sejtekből RNS-t izolálni, ezután pedig RNS szekvenálás módszerét alkalmazva elemezést készítettünk, melyből meghatároztuk a hifás állapotban expresszálandó géneket és ezek szintjét, és a funkcióikat. (10. ábra) Ennek során kiderítettük, hogy a *Sch. japonicus* miceliális növekedése igen komplex folyamat, hiszen számos különböző funkcionális kategóriába tartozó gén működése módosult. (10. ábra)

A *C. albicans* dimorf átváltásához szükséges génjei alapján megszerkesztettük a *Sch.japonicus* feltételezett, élesztő-hifa átváltásért felelős szignalizációs hálózatát (11. ábra). Az itt szereplő gének feltehetően fajtól független, evolúciósan konzervatív résztvevői a dimorfizmusnak.

Bioinformatikai összehasonlítások után kiválasztottunk egy a dimorfizmusban szerepet játszó központi regulátor gént (*pka1*), amit töröltünk a *Sch. japonicus* kromoszómájáról. (12. ábra)

Karakterizáltuk a *pka1* mutánst, melynek hifás formába történő átváltása időben lassabb volt, s rövidebb hifákat

eredményezett. A mutáns törzs fenotípusos vizsgálata rávilágított arra is, hogy a *pkaI* gén milyen sokoldalú regulátor. Hiszen a mutáns sejtekben nem csak a dimorfizmus folyamata sérült, hanem a stressz válasz is (14-16. ábrák).

A *pkaI* mutánsból RNS-t izoláltunk, hogy a *pkaI* deléció okozta pleiotróp hatásról és a *pkaI* által szabályzott génekről részletesebb képet kaphassunk. Az elemzés segítségével megszerkesztettük a *pkaI* szignalizáció feltételezett útvonalát, meghatároztuk a *pkaI* lehetséges cél génjeit. (13. és 17. ábrák)

I. Introduction and aims

Numerous fungi are able to infect plants, animals and humans while others are saprophytes and live in the soil. Those who have the ability to switch between different morphological forms (dimorphism) can spread, adapting better than non-dimorphic species. Namely, they are able to survive in special environments. Among dimorphic pathogenic fungi there are dangerous plant pathogens, which destroy the host plant or cause it to be unfit to eat the crops. One of them is *Ustilago maydis*, which is the microscopic pest of maize and can cause uncontrolled proliferation in it. The members of the *Fusarium* genus are also dangerous to agriculture. They are toxin producers. These toxins can be swallowed with crops and can cause death in animals and humans. (Sobrova et al, 2010) *Cryptococcus neoformans* can cause pneumonia and meningitis in immunocompromised patients. *Candida albicans* is also a human pathogenic fungus, which normally resides in the gut. However, it is also able to cause serious infections and death in cases of immunosuppression. (Pfaller et al, 2006; Mayer et al, 2013) It is often hard to study these dimorphic fungi because they require special circumstances, or they can be diploids (such as *C. albicans*), which makes the deletion of their genes and their molecular manipulations difficult. Furthermore, their

genomic sequences are often not or partially annotated. Work with these fungi requires precaution because of their pathogenicity. The genetic background of dimorphism shows a high degree of conservation, therefore a non-pathogenic and dimorphic fungus can be an excellent model organism. Its study can help us to understand the molecular background of dimorphism and shed light on both the general and species-specific features of mycelial growth. That was the reason why we started to work with the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*, which belongs to an early branched evolutionary group. This species is the oldest member of the *Schizosaccharomycetales* genus, which preserved the ability of mycelial growth of their common ancestors (Sipiczki, 1995). Moreover, its haploid chromosome set makes gene manipulations easy. Earlier results suggested that the morphological transition of *Sch. japonicus* required solid substrates (Sipiczki et al., 1998b).

This feature makes the molecular investigation of hyphae production more difficult. Therefore, the aim of this study was to investigate mycelial growth of *Sch. japonicus*. We wanted to:

- 1) find those environmental factors which stimulate or inhibit the production of long hyphae.

- 2) examine the molecular background of dimorphism.
 - a) identify the genes which are involved in mycelial growth.
 - b) delete and characterize an important regulator gene, and reveal its role in dimorphism.
 - c) reveal which genes are regulated by this regulator protein.
 - d) predict a possible signalization pathway of dimorphism.
- 3) compare these data with results of other dimorphic species.

II. New scientific results

II.1 Induction of hyphal growth in liquid media

Earlier results suggested that the morphological transition of *Sch. japonicus* required solid substrates (Sipiczki et al., 1998b). However our results showed that minimal media (poor conditions), 1M sorbitol (Fig. 1 B, C), or fetal bovine serum (FBS) could induce filamentous growth also in liquid (Fig. 2). Interestingly, the inducing effect of FBS could be hampered by lowering the pH (Fig 3) or boiling the medium. (Fig. 4)

II.2 Effects of the environmental factors on the morphological switch

In our study we investigated the effects of environmental factors on the dimorphism of *Sch. japonicus*. The results revealed that low external pH (Fig. 5), 37°C (Fig. 6) and the presence of peptone could induce hyphal growth in solid media. (Fig. 7) We used both complete media (YPA, YEA) and minimal medium (EMMA) for our experiments. To determine the ability of *Sch. japonicus* cells to use amino acids as N-source, the cells were also streaked on the surface of the minimal medium (EMMA) lacking N-source and supplemented

with an amino acid. The results showed that *Sch. japonicus* was able to use the amino acids as a nitrogen source except for proline. What is more, arginine and methionine enhanced filamentous growth. (Fig. 8).

We also found inhibiting conditions, such as pH8 and 0,5 mg/ml adenine and 1mg/ml guanine. (Fig 5 D, Fig. 9)

II.3 Identification of genes which are involved in dimorphism

We isolated total RNA both from *Sch. japonicus* hyphae and yeast cells. These RNA were sequenced. We found 2903 genes with altered gene expression levels. 1366 genes were up-regulated and 1537 genes were down-regulated. But later, just a small portion of the genes (\log_2 fold changes were -2 and lower, and +2 and higher) were studied. Functions of the genes were determined in the Database of Broad Institute by automated genome annotation. GO (Gene Ontology) numbers of the genes were identified using their orthologs in the *Sch. pombe* database (<http://www.pombase.org>). These results confirm that mycelial growth is quite complex and different cell processes are involved in it. (Fig. 10) These results were compared to data of the distant relative *C. albicans*. The comparison revealed that the molecular pathways of

dimorphism were similar in the two species. (Fig 11) Later, one of the filament associated genes (*pka1*), which encoded the protein kinase A enzyme was studied (Fuller and Rhodes, 2012).

II.4 Construction of the *pka1*Δ strain

To reveal the exact function of the *pka1* gene, deletion was created in the coding region of the gene by several steps and this deletion construction was then transformed into the 7-1 wild-type cells to replace the wild-type chromosomal *pka1* gene with it. G418 resistant colonies were isolated and checked by colony PCR for the presence and localisation of kanamycin cassette. One homologous recombinant colony was further investigated. (Fig. 12)

II.5 RNA sequencing and phenotypic study of the *pka1* mutant strain

Our results demonstrated that loss of *pka1* gene was not lethal. The mutant strain showed pleiotropic phenotype, therefore the *pka1* regulated genes were identified. RNA sequencing revealed 1986 genes with altered gene expression levels, but only 366 showed

very high or low values. Categorization of the genes by GO functions (Fig. 13) suggests that Pka1 protein regulates not only dimorphism but other cell processes, such as stress response. (Fig. 14, 15, 16) Based on the results of RNA sequencing and phenotypic characterisation of the mutant cells a putative pka1-pathway was created.(Fig. 17)

Summary

Dimorphism is an important feature of pathogenic fungi, and is in close relation with their virulence and their adaptation to various environments (Molero *et al.*, 1998; Whiteway and Oberholzer, 2004).

Our aim was to study dimorphism and its genetic background in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. This model organism belongs to the *Schizosaccharomyces* group, and it is unique in its group in showing dimorphism. Namely, it is able to switch from yeast to hyphal morphology.

First, we studied the effects of environmental factors on dimorphism. Several external conditions were investigated both on solid and liquid media. Our results showed that high osmotic pressure, which is involved in MAPK signalling pathway

(Duran et al, 2010), and poor conditions could cause mycelial growth (Fig. 1). However, the strongest inducer was the Fetal Bovine Serum (Fig. 2 and 3). Its positive effect could be hampered by heat and was dependent on pH, temperature and concentration of the serum (Fig. 2 and 4). Generally, the uninduced and induced mycelial growth of *Sch. japonicus* could be improved by lower external pH (Fig. 5). This feature of the cells resembled *C. neoformans* and *U. maydis* (Wickes, 1996; Ruiz-Herrera et al, 1995) rather than *Y. lipolytica* and *C. albicans* (Ruiz-Herrera and Sentadreu, 2002; Vylkova, 2011). Higher temperature also increased the morphological switch (Fig. 6), unlike *H. capsulatum* (Maresca and Kobayashi, 1989) and similarly to *C. albicans* (Soll et al, 2003). Peptone and certain amino acids also had rather a positive effect on hyphae production (Fig. 7 and 8). Now, our results also revealed that nucleobases, such as adenine and guanine, inhibited mycelial growth (Fig. 9), in contrast to *C. albicans*, where the presence of adenine promoted the switch between white and opaque forms (Huang, 2012).

Later, our aim was to identify the regulatory and molecular mechanisms of dimorphism. Transcriptional profile of hyphae was investigated and the genes which showed altered mRNA levels in hyphae were identified (Fig. 10). Comparison of these data with those of *C. albicans* (reviewed in Ernst, 2000

and Biswas et al., 2007) revealed common genes of the dimorphic pathways in the two distant relative species (Fig.11).

Several regulators, such as *pka1* gene was also found among the dimorphic genes (Fig 11). Thus, a *pka1* deleted mutant was created (Fig 12), whose RNA sequencing and phenotypic studies revealed the exact role of the *pka1* protein in the cells (Fig 13). In contrast to other pathogenic fungi and similarly to *Sch. pombe* (Sonneborn et al, 2000; Toda et al, 1987), the absence of the *pka1* gene was not lethal. Furthermore, it regulated not only dimorphism and elongation of hyphae, but cell size, aging and stress responses as well (Fig 17). Its target genes were involved in the transmembrane transport, signaling, and carbohydrate metabolism (Fig 17).

Taken together, our results confirmed that morphological switch is a very complex process and involves several hundred different genes. Our study could shed light on both the general and species-specific features of dimorphism. The identified genes and the PKA pathway can be the molecular targets of antifungal drugs and vaccines.

Papp László Attila Publikációs lista/Publication list

A dolgozat témájához kapcsolódó referált, nemzetközi folyóiratban megjelent cikk/Articles published in international journals:

1. Papp, L., Sipiczki, M., Holb, I. J. & Miklos, I. Optimal conditions for mycelial growth of *Schizosaccharomyces japonicus* cells in liquid medium: it enables the molecular investigation of dimorphism. *Yeast* **31**, 475-482 (2014).
2. Sipiczki, M. *et al.* Phylogenetic and comparative functional analysis of the cell-separation alpha-glucanase Agn1p in *Schizosaccharomyces*. *Microbiology* **160**, 1063-1074 (2014).

Egyéb/Others:

Előadások/Presentations:

Papp László Attila, Új Cseppek a Tengerben, Fiatal Kutatók Bemutakozása. DAB székház, Debrecen, 2012

Papp László Attila, Dimorfizmus vizsgálata *Schizosaccharomyces japonicus*-ban, XIII. Genetikai Műhelyek Magyarországon, Szeged, 2014

Poszterek/Posters:

1. Laszlo PAPP, Ida MIKLOS, Matthias SIPICZKI. Effect of environmental conditions on the *Sch.japonicus* dimorphism, MMT, Budapest, 2012
2. L.A Papp, Ida Miklós, M. Sipiczki. Dimorphism in *Schizosaccharomyces japonicus*, MMT, Keszthely, 2012
3. Papp L.A., Miklos I., Sipiczki M. Environmental sensing through protein kinase A in *Schizosaccharomyces japonicus*, 30th ISSY, Slovakia, 2013
4. László Attila Papp, Matthias Sipiczki, Ida Miklós. Protein kinase A signaling in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*, Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2015
5. Lajos Ács-Szabó, László Attila Papp, Matthias Sipiczki, Ida Miklós. Conserved synteny and gene order determination in *Schizosaccharomyces*, Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2015

IV. Irodalmi jegyzék/References

Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007 Jun;71(2):348-76.

Duran R, Cary JW, Calvo AM. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins (Basel).* 2010 Apr;2(4):367-81.

Ernst JF. Regulation of dimorphism in *Candida albicans*. *Contrib Microbiol.* 2000;5:98-111.

Fuller KK, Rhodes JC. Protein kinase A and fungal virulence: a sinister side to a conserved nutrient sensing pathway. *Virulence.* 2012 Mar-Apr;3(2):109-21.

Gao L, Kelliher T, Nguyen L, Walbot V. *Ustilago maydis* reprograms cell proliferation in maize anthers. *Plant J.* 2013 Sep;75(6):903-14.

Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence.* 2012 May 1;3(3):251-61.

Maresca B, Kobayashi GS. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Microbiol Rev.* 1989 Jun;53(2):186-209.

Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C,

Sánchez-Pérez M, Nombela C. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol.* 1998 Jun;1(2):95-106.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013 Feb 15;4(2):119-28.

Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. *Clinical Infectious Diseases.* 2006;43:53-514

Ruiz-Herrera Jose, León CG, Guevara-Olivera L, Cdrabez-Trejo A. Yeast mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology.* 1995;141: 695–703.

Ruiz-Herrera J, Sentandreu R. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol.* 2002 Dec;178(6):477-83.

Sipiczki M. Phylogenesis of fission yeasts. Contradictions surrounding the origin of a century old genus. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1995 Aug;68(2):119-49.

Sipiczki M, Takeo K, Grallert A. Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology.* 1998 Dec;144 (Pt 12):3475-85.

Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova M, Zeman L, Kizek R. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip Toxicol.* 2010 Sep;3(3):94-9.

Soll DR, Lockhart SR, Zhao R. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2003 Jun;2(3):390-7.

Sonneborn A, Bockmühl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D, Ernst JF. Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. Mol Microbiol. 2000 Jan;35(2):386-96.

Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. Cell. 1987 Jul 17;50(2):277-87.

Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. MBio. 2011 May 17;2(3):e00055-11.

Whiteway M, Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol. 2004 Aug;7(4):350-7.

Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 9;93(14):7327-31.