

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A gomba dimorfizmus vizsgálata: citológia és genetikai szabályozás Analysis of fungal dimorphism: cytological and genetical regulation

Készítette:
Enczi Klára

Témavezető:
Dr. Sipiczki Mátyás



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2010

1. Bevezetés

A gombák általában két formában fordulhatnak elő: vagy unicelluláris élesztő-szerű, vagy multicelluláris fonalas alakokban (micélium, vagy pszeudomicélium). A di- és polimorf fajok jellegzetessége az, hogy különböző környezeti hatásokra képesek az élesztő-szerű és a fonalas alak közötti átváltásra. Számos patogén gombafaj esetében a dimorf átalakulás képessége összefüggésben áll a virulenciával, mert a gazdatest fertőzéséhez szükség van a morfológiai váltásra (pl. Odds, 1985, Lo és tsi, 1997, Madhani és Fink, 1998). A dimorf átalakulás komplex folyamat, amely környezeti szignálok eredményeként a sejt működésének jelentős megváltozásához vezet. Megismerésével nemcsak a gomba patogeneziséről, hanem az eukarióta sejt differenciálódásáról is információt nyerhetünk.

A dimorfizmus kutatásához előnyös olyan fajokat választani, amelyek nem patogének, azaz nem rendelkeznek megbetegítő képességgel, de rendelkeznek az átváltás tulajdonságával.

Az Ascomycota *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*, egy nem patogén, dimorf hasadó élesztőgomba, amely környezeti tényezők indukáló hatására képes különböző morfológiai alakok létrehozására. Az élesztő-micélium átalakulás során vagy a táptalaj felületén növekvő pszeudomicéliumot, vagy a táptalajba behatoló, invazív valódi micéliumot képez. A *S. japonicus*-t dimorf modellszervezetként sikerrel alkalmazzák. A Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén elvégzett kísérletek a rendelkezésre álló eszköz és módszerkészlet bővülését, és további citológiai megfigyeléseket és molekuláris biológiai adatokat eredményeztek (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b, Bozsik és tsi, 2002). A *Schizosaccharomyces* genus másik ismert tagja, az élesztő genetikai kutatásokban rutinszerűen alkalmazott *S. pombe* (Yanagida, 2002). Amoah-Buahin és társai 2005-ben, majd Dodgson és társai 2009-ben megjelent

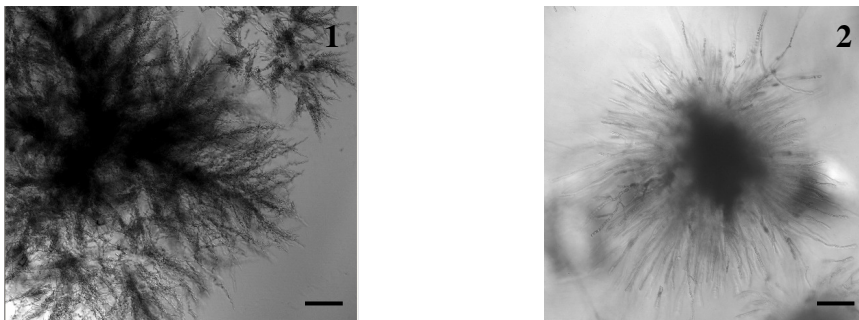
cikkükben bemutatták, hogy ennél a fajnál is indukálható az invazív, fonalas alak kialakulása.

Célunk a dimorfizmusról rendelkezésre álló kutatási eredmények bővítése volt: az átalakulás hátterében lejátszódó citológiai, genetikai és proteomikai változásokról szerettünk volna, e két hasadó élesztőgomba faj (*S. japonicus* és a *S. pombe*) segítségével, minél részletesebb betekintést nyújtani.

2. Új tudományos eredmények bemutatása

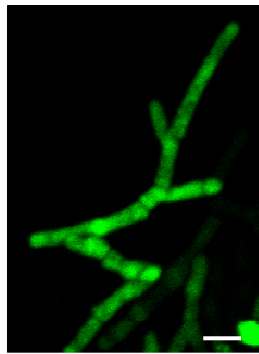
2.1. Élesztő-micélium átalakulás összehasonlítása

Első alkalommal vált lehetővé a *S. pombe* és a *S. japonicus* micéliumképzésének összehasonlítása, a mindkét faj számára élesztő-micélium átalakulást indukáló LNBA táptalajon (1. ábra). A *S. pombe* micéliuma, eltérően közeli rokonától, köteges szerkezetű. A vezető fonalak mögötti régió kompakt és az elágazások által erősített. A két faj micéliumot fejlesztő tenyészetét megvizsgálva azt láttuk, hogy a dimorf átváltás és a hifák növekedése a tenyészetek periferiájáról, párhuzamosan több pontból indult. A telepek körül megjelenő hifák mellett a tenyészet belső részein az élesztősejtes formát figyelhettük meg.



1. ábra Micéliumot képző telepek. (1) *S. pombe* L975 törzs, 21 nap, 30°C, LNBA táptalaj. Méretvonal: 100 μ m. (2) *S. japonicus* 7-1 törzs, 8 nap, 30°C, LNBA táptalaj. Méretvonal: 100 μ m.

A *S. pombe* élesztő-micélium átalakulásának kezdeti lépéseit is nyomon követtük. A speciálisan kialakított tárgylemez arra alkalmas folyosóiban növekvő *S. pombe* élesztősejtjei jellegzetes mintázatba rendeződtek. Ebben a kezdeti stádiumban a tenyészet központi részein élesztősejteket, a perifériális részeken pedig az osztódások után együtt maradt, meghosszabbodott leánysejteket és 3-5 sejtből álló, rövid pszeudohifákat találtunk (2. ábra). A citoplazmájukban zöld fluoreszcens proteint termelő sejtekben, jól kivehetővé váltak a szeptumok és a sejtmagok. Megfigyelésink szerint ezekben a több sejtből álló pszeudohifákban sejtenként egy sejtmag található. Úgy gondoljuk, hogy a köteges szerkezet kialakulásához nagy sejtsűrűség és a jellegzetes elrendeződés megtartása szükséges.

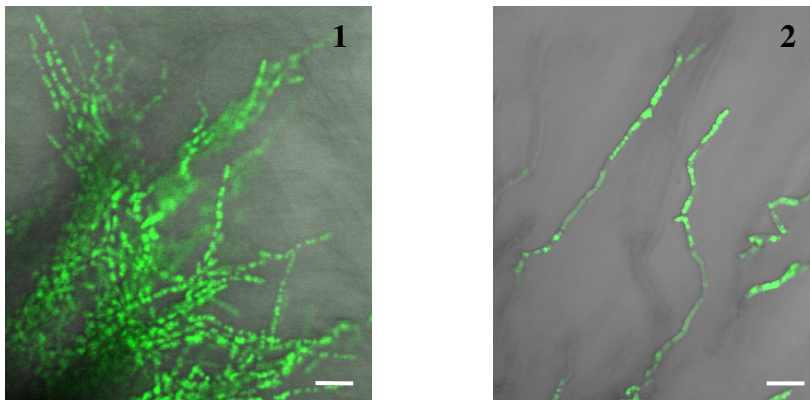


2. ábra Többsejtes, rövid pszeudohifa a *S. pombe* 1165 törzsének 15 napos tenyészetében. Méretvonal: 5 μ m

A *S. japonicus* micéliuma gyorsan fejlődött a legtöbb, kipróbált táptalajon (kivételet a cAMP hozzáadása és az agar koncentráció csökkentése jelentett – ekkor nem zajlott le a dimorf átalakulás). A *S. pombe*-hoz viszonyítva az agarba fúródott hifáinak a mérete, a Petri csészében, vagy a csatornáknak tenyésztve, azonos idő alatt hosszabbnak bizonyult. A tárgylemezben kialakult fonalaiban jellegzetes, óriásméretű, poláris vakuólumait festés nélkül is jól láthattuk.

2.2. A vakuolumok szerepe a hifa növekedésben

A *S. japonicus* élesztő-micélium átalakulásában fontos szerepe van a megfigyelt, poláris óriás vakuolumok kialakulásának. A *S. pombe* élesztő- és hifasejtjeinek vakuolumait CDCFDA festéssel tettük láthatóvá (3/1. ábra). Mindkét sejtípusban azonos jelintenzitást, ez alapján feltételezhetően azonos méretű vakuolumokat találtunk, tehát tapasztalataink szerint a vakuolumok nem járulnak hozzá a *S. pombe* dimorf átalakulásához.



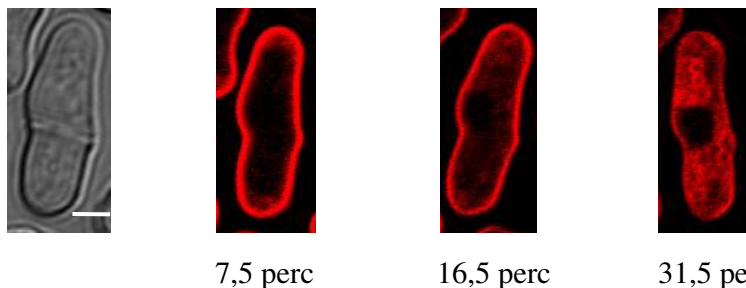
3. ábra A vakuolumok eltérő festődése a *S. pombe* L975 és *S. japonicus* 7-1 hifáiban. (1) *S. pombe* agarban kialakuló micéliuma CDCFDA-val festve (2) a *S. japonicus* agarban kialakuló hifái CDCFDA-val festve. Méretvonal: (1) 20 μm (2) 50 μm

A *S. japonicus* vad típusú sejtjeinek vakuolumait a tárgylemezben festés nélkül figyelhettük meg, és az agarból kivágott minták esetében több, speciális festési eljárással (FM4-64, CDCFDA) tettük láthatóvá. Az élesztősejtekben is többféle alakú vakuolumot találtunk: ovális, kerek, tubuláris, amelyeknek a megfelelőit a hifasejtekben is megfigyeltünk. Kizárólag a hifasejtekben találtunk a sejt térfogatát majdnem teljes mértékben kitöltő vakuolumokat, amelyeknek feltételezéseink szerint lúgosabb a

kémhatása, mint a kisebb méretűeknek (3/2. ábra). A vakuólumok fúzója a hifasejtékben is lejátszódik, ami azt a feltevésünket támasztja alá, hogy a *S. japonicus* vakuólumai a hifáik növekedéséhez is szükségesek.

2.3. Az endocitózis nyomon követése a *S. japonicus* sejtjeiben

A vakuólum megjelenítéséhez alkalmazott festékek között találjuk a Vida és Emr által élesztők esetében először használt FM4-64-et (Vida és Emr, 1995). Ez nemcsak vezikulumok festésére szolgál, hanem endocitózis markerként is működik. A *S. japonicus* vad típusú élesztősejtjeiben az endocitózis során időben a plazmamembrán válik először láthatóvá, majd a korai és késői endoszómák és végül a vakuólum membrán (4. ábra).



4. ábra. A *S. japonicus* bipolárisan növekvő élesztősejtjének FM4-64 felvétele, az endocitózis időbeli követése. Méretvonal: 4 μm .

Ezt az endocitózis markert a *S. pombe* esetében már korábban használták. A két kísérlet alapján megállapítható, hogy a két faj élesztősejtjeiben a folyamat azonos lépéseken keresztül zajlik, de a lépések között több idő telik el a *S. japonicus* esetében. Ez a sejtek méretének különbségéből adódik. A *S. japonicus* hifáinak monopolárisan növekvő csúcssejtjeiben megfigyelt jellegzetes erős festék akkumuláció, feltehetőleg a fonalas gombáknál leírt, aktív membrántranszport folyamatokra utal. A

polarításban is sérült mutánsok tanulmányozása során az is kiderült, hogy a festék felvétel a sejt polarításától függött.

2.4. A *S. japonicus* és a *S. pombe* morfológiai átalakulásában szerepet játszó gének

A *S. japonicus* élesztő-micélium átalakulásában szerepet játszó gének megismerése érdekében a micélium-képzésre nézve vad típusú, de különböző auxotróf markerekkel rendelkező *S. japonicus* törzsekből, UV-mutagenézist követően, micélium-képzésben sérült myc^- mutánsokat izoláltunk. Mutáns törzseinket kereszteztük, majd rekombinációs analízist végeztünk. Vizsgálataink alapján hat gént azonosítottunk, amelyek a *S. japonicus* élesztő-micélium átalakulásában részt vesznek.

Tapasztalataink szerint a *S. japonicus* dimorf átalakulását, a sejt életében alapvetően fontos citológiai változások kísérik. A sejtalak szerint három csoportba (sep-szerű, kerek és rövid sejtek) sorolt myc^- mutánsainknál ezeket a folyamatokat vizsgáltuk mikroszkópos, fluoreszcens mikroszkópos technikával (5. ábra).

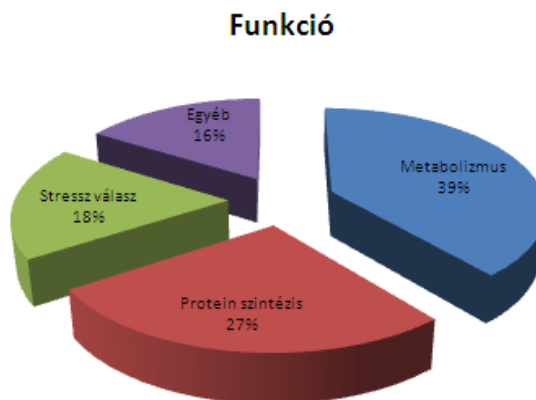


5. ábra Különböző alakú sejtek a *S. japonicus* vad (7-1) és mutáns törzsek exponenciális fázisban lévő tenyészeiben. (1) vad típusú törzs (2) osztódás után együtt maradó sejtek alkotta mikrohifa a 7-63-as mutáns exponenciális fázisban lévő tenyészetben (3) rövid és kerek sejtek a 7-148-as mutáns 24 órás, YEL-ben nevelt tenyészetében. Méretvonalak: 3 μ m

Az egyes mutánsoknál megfigyelt hibák arra utalnak, hogy az aktin disztribúció, a vakuólum fúzió, a sejt szeparáció az élesztő-micélium átváltás szempontjából kiemelkedően fontos citológiai események.

A *S. japonicus* myc⁻ mutánsok ozmotikus érzékenységét KCl, CaCl₂, NaCl, MgCl₂, szorbittal kiegészített komplett táptalajokon végeztük. Mert úgy gondoltuk, hogy ezekből a stressz-érzékenység vizsgálatokból több adatot gyűjthetünk a mutációk háttérében álló génekről. Mutánsaink közül a 7-159-es törzskönyvi számú mutáns esetében találtunk kiemelkedő klorid érzékenységet, ami esetleg a stressz tolerancia kialakításában résztvevő, szabályozó útvonal hibájára utalhat. A 7-176-os törzskönyvi számú mutáns jelentős β -glükánáz érzékenysége azt mutatja, hogy a sejtfal összetételének megváltozása gátolhatja a poláris növekedés megindulását és így az élesztő-micélium átalakulást. Erre más dimorf fajok esetében is több példát találhatunk.

A *S. pombe* L975-ös törzskönyvi számú heterotallikus törzs élesztősejtes és micéliális tenyészetének összehasonlító proteomikai vizsgálata során, 149 fehérjét sikerült azonosítanunk. Közöttük a metabolizmusban, a stressz válaszban és a translációban szerepet játszó proteineket találtunk a legnagyobb számban (6. ábra).



6. ábra Funkció szerinti százalékos eloszlás a 149 azonosított fehérje között.

A 149 fehérje közül 11 olyat találtunk, amely csak a micéliális tenyészet mintájából volt kimutatható. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a *S. pombe* micélium-képzésében a TOR útvonal, a nitrogén mennyiség érzékelése révén, fontos szerepet játszhat. Egy másik a *S. pombe* micéliális mintából azonosított fehérje is befolyásolhatja a dimorf átalakulást. A konzervatív gomba fehérje homológjának, a *Sa. cerevisiae* SNO4 proteinjének diszrupciója a pseudomicélium-képzés sérüléséhez vezetett. Egy másik elmélet szerint, amely az első szisztematikus gén diszrupciós és túltermeltetési vizsgálatokon alapult, a mitokondriális működés fontos szerepet játszik a fonalas alak kialakulásában. Az élesztő-micélium átalakulást szabályzó jól ismert szignál útvonalak mellett a mitokondriális retrográd útvonal szerepét hangsúlyozták, mint negatív regulátor. Öt, kizárólag a micéliális mintánkban kimutatható mitokondriális fehérjét találtunk.

3. Irodalomjegyzék

1. Amoah-Buahin E, Bone N, Armstrong J (2005) Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Eukaryot Cell. 4: 1287-97
2. Bozsik A, Szilagyi Z, Benko Z, Sipiczki M (2002) Marker construction and cloning of a cut1-like sequence with ARS activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. Yeast 19: 485-98
3. Dodgson J, Avula H, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Hayles J, Armstrong J. (2009) Functional genomics of adhesion, invasion, and mycelial formation in *Schizosaccharomyces pombe*. Eukaryot Cell. 8:1298-306
4. Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GG (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. Cell 90 (5): 939-49

5. Madhani HD, Fink GR (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends in Cell Biol.* 8: 348-35
6. Odds FC (1985) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol.* 12: 45-93
7. Sipiczki, M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S, Miklos I (1998a) Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology* 144: 1319-1330
8. Sipiczki M, Takeo K, Grallert A (1998b) Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology* 144: 3475-3485
9. Yanagida (2002) The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* 3: COMMENT2003.
10. Vida TA, Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol.* 128: 779-92

4. A doktori munka során megjelent publikációk jegyzéke

Cikkek:

1. Szilágyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M (2004) Characterization of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. *Gene.* 348:101-9
2. Enczi K, Yamaguchi M, Sipiczki M (2007) Morphology transition genes in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 92:143-54
3. Miklos I, Szilagy Z, Watt S, Zilahi E, Batta G, Antunovics Z, Enczi K, Bähler J, Sipiczki M (2007) 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: 225-38

Előadások:

1. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2002) Marker konstrukció egy lehetséges új modellszervezetben a genetikai kutatások számára. TDK Biológia Szekció (Debrecen)
2. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2002) Study of the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. Ann. Meeting Hung. Soc. Microbiol., Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49:395. (Balatonfüred)
3. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2004) *Schizosaccharomyces japonicus* egy új modellszervezet a genetikai kutatások számára. Genetikai műhelyek Magyarországon. (Szeged)
4. Szilágyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M (2004) Fork-head típusú transzkripciós faktorok a hasadó élesztőben. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése. Absztrakt füzet 121.o. (Keszthely)
5. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2004) A dimorfizmus jelenségének vizsgálata a *Schizosaccharomyces japonicus* hasadó élesztőben. Magyar Tudomány Napja. (Debrecen)
6. Sipiczki M, Enczi K (2005) Roles of the fission yeast cell wall in cell polarisation and division: a combined genetic and morphological approach. 1st International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Abstract book p: 974.
7. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2005) A *Schizosaccharomyces japonicus*, egy új modellszervezet a genetikai kutatások számára. VI. Magyar Genetikai Kongresszus XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. (Eger)

8. Kajdacs E, Enczi K, Sipiczki M (2006) Phylogenetic position of the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* according to the recently isolated actin gene. Ann. Meeting Hung. Soc. Microbiol., Acta Microbiol. Immunol. Hung. 53:285. (Keszthely)

Poszterek:

1. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2001) A *Schizosaccharomyces japonicus* dimorfizmusának vizsgálata. Magyar Tudomány Napja. (Debrecen)
2. Sipiczki M, Bozsik A, Enczi K (2002) Cytological and genetic investigations into the regulation of dimorphism and growth polarity transitions in *Schizosaccharomyces japonicus*. VIII International Fungal Biology Conference. p: 77 (Guanajuato, Mexico)
3. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2003) Mycelial mutants in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. 1st FEMS Congress. Supplement to abstract book p: 63 (Ljubljana)
4. Miklos I, Szilagy Z, Benko Z, Enczi K, Batta G, Sipiczki M, Bahler J (2005) Analysis of transcriptional profiles of *S. pombe sep10* and *sep15* mutant strains, which encode subunits of the Mediator complex. XXIInd Int. Conf. Yeast Genet. Mol. Biol. Yeast 22:S152. (Pozsony)
5. Miklos I, Szilagy Z, Watt S, Zilahi E, Batta G, Antunovics Z, Enczi K, Nagy R, Szaszi E, Bahler J, Sipiczki M (2007) Transcriptional regulation in *Schizosaccharomyces pombe* cells. 15th Internat. Cong. Hung. Soc. Microbiol. Acta Microbiol Immunol. Hung. 54:83-84.

1. Introduction

Fungi generally display either of the two growth modes, unicellular yeast-like or multicellular filamentous (mycelial or pseudomycelial). The di- and polymorphic fungi, upon environmental stimuli, are able to switch between the yeast-like and the filamentous growth modes. In many human and plant pathogenic fungi, the ability to switch between these forms has been correlated with virulence because during the infection process, morphological transitions are often required (Odds, 1985, Lo et al, 1997, Madhani and Fink, 1998). Dimorphic transition is a complex phenomenon that involves extensive modification of cellular machinery in response to environmental signals. Understanding its process is not only important because its involvement in fungal pathogenesis, but also it serves as an experimental model of eukaryotic cell differentiation.

In order to investigate fungal dimorphism it is advised to choose a model species that is non-pathogenic and capable of switching between unicellular and filamentous forms. The ascomycete *S. japonicus* var. *japonicus* (*S. japonicus*) is a non-pathogenic, dimorphic fission yeast capable of producing alternate morphological forms in response to environmental changes. It exhibits yeast to mycelium dimorphism, i.e. the ability to produce a filamentous form which either grows on the surface of the substrate as pseudomycelium or penetrates the substrate and forms a true mycelium (Sipiczki, et al. 1998a; Sipiczki, et al. 1998b).

S. japonicus has proved to be an excellent model organism for investigation of dimorphism. Experiments carried out by the research group at the Department of Genetics and Applied Microbiology resulted in method development, expanding data and tool resources, cytological observations and molecular biological results (Sipiczki et al, 1998a, 1998b, Bozsik et al, 2002). *S. pombe* (one of the other species of the genus *Schizosaccharomyces*)

is one of the best-studied, routinely used model organisms in yeast research (Yanagida, 2002). Its ability to induce invasive, filamentous forms has been recently described by Amoah-Buahin, Dodgson and colleagues (Amoah-Buahin et al, 2005, Dodgson et al, 2009).

Our aim was to further explore the cytological, genetical and proteomical background of dimorphism using the two fission yeast *S. japonicus* and *S. pombe* as experimental models.

2. New scientific results

2.1. Comparing yeast-mycelium transition of the two fission yeast

On LNBA media, which supported the mycelial growth of both studied *Schizosaccharomyces* species *S. pombe* and *S. japonicus*, we could compare their characteristic mycelial growth (Figure 1.). The *S. pombe* mycelium, unlike to its close relative, resembles a rope-like structure: behind the fast growing region of the mycelium growing invaded filaments form a dense network, hold together by branches. Examining the cultures of the two species, we concluded that yeast-to-mycelium transition and establishment of the mycelial phase occurred at the periphery of the inoculum, from a few sites. Apart from the hyphae around the colonies we found yeast cells in the middle of the colony.

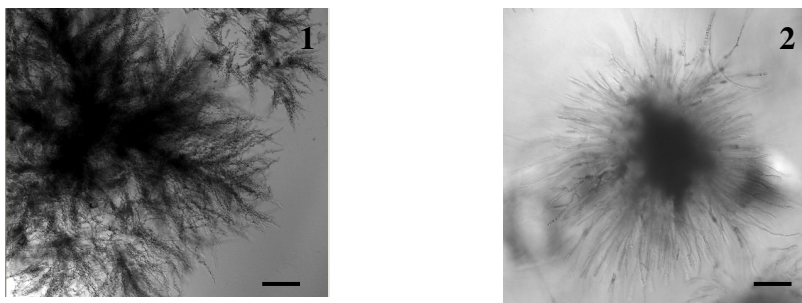


Figure 1. Mycelium forming colonies. (1) *S. pombe* L975 strain, 21 days of incubation on 30°C, LNBA medium. Bar: 100 μ m. (2) *S. japonicus* 7-1 strain, 8 days of incubation, 30°C, LNBA medium. Bar: 100 μ m.

We could also follow the early steps of the yeast-mycelium transition of *S. pombe*. In the channels of the special microscope slide filled with media inducing hyphal growth, the *S. pombe* elongated yeast cells arranged in a special order. At a later stage of the hyphal formation we could observe unseparated daughter cells more elongated than yeast cells, and short hyphae consists of 3-5 cells (termed as pseudohyphae, Figure 2.) at the edge of the inoculum and yeast cell in the centre. Using cells producing green fluorescent protein we could differentiate septa and nuclei in these short hyphae. According to our observation these pseudohyphae cells contains one nucleus per cell. We think that characteristic cell distribution and high cell density are required to create the rope-like mycelial structure.

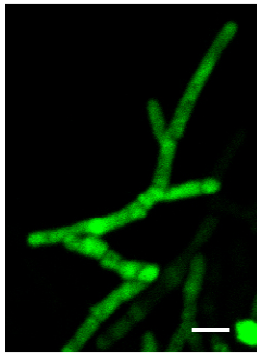


Figure 2. Multicellular pseudohyphae in the culture of *S. pombe* 1165 strain after 15 days of incubation. Bar: 5 μ m

The mycelia of *S. japonicus* grow faster on almost every, tested media (except when we added cAMP to the media or decreased the agar concentration in those cases the dimorf transition did not occur). Comparing the length of the invasive hyphae of *S. japonicus* with *S. pombe*, under the same conditions whether culturing them on Petri dishes, or in the channels, *S. japonicus* hyphae grew longer. In case of the filaments growing to the

nutrient rich pole of the channels we could see its characteristic large polar vacuoles as well.

2.2. Role of the vacuoles in the growing hyphae

These polar vacuoles appear through the extensive vacuolation play central role in the *S. japonicus* yeast-to-hyphae transition. Vacuoles of *S. pombe* yeast and hyphae cells were visualized by CDCFDA (Figure 3/1.). Detection of the same signal intensity in case of both cell types, could mean that the cells maintained the same vacuole size. According to this hypothesis the vacuoles of *S. pombe* do not contribute to the dimorf transition.

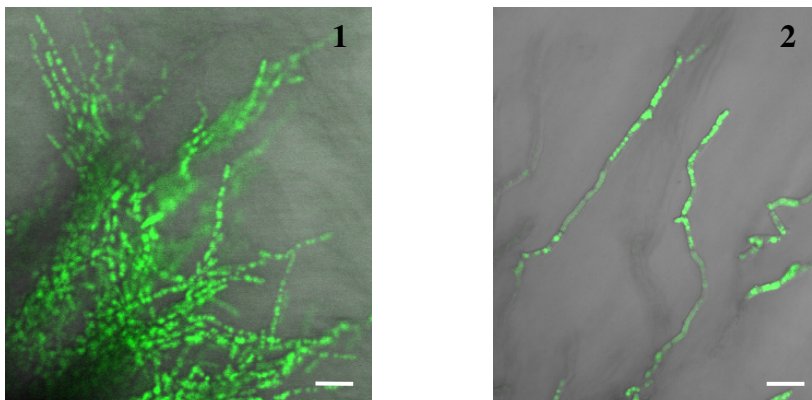


Figure 3. Different signal intensity of vacuoles in *S. pombe* L975 and *S. japonicus* 7-1 hyphae cells. (1) invasive hyphae of *S. pombe* visualized by CDCFDA (2) invasive hyphae of *S. japonicus* visualized by CDCFDA. Bars: (1) 20 μm (2) 50 μm

In the channels the vacuoles of *S. japonicus* wild type cells can be observed without staining and in case of the agar samples these can be visualized by fluorescent dyes (FM4-64, CDCFDA). Vacuoles in the yeast cells display pleomorphism: ovoid, spherical, tubular shapes; the same types can be

observed in the hyphae cells as well. Exclusively in the hyphae cells we found large vacuoles which filled up most of the cell. We assume that these large vacuoles have more alkalic pH than the smaller ones (Figure 3/2.). According to our observation vacuole fusion takes place in the hyphae cells, that supports our hypothesis that vacuoles needed not only for the switch between yeast and mycelial phases, but for the growth of the hyphae as well.

2.3. Following the internalization of the endocytotic dye in the cells of *S. japonicus*

Out of the two fluorescent dyes we used for visualizing vacuoles FM4-64 is the one that Vida and Emr applied on the yeast cells for the first time (Vida and Emr, 1995). This stain not only labels the vesicles, but it serves as an endocytosis marker. A time course examination of FM4-64 internalization in *S. japonicus* wild type living yeast cells shows that the plasma membrane became visible first then the early and late endosomes and finally the vacuole membranes (Fig. 4.).

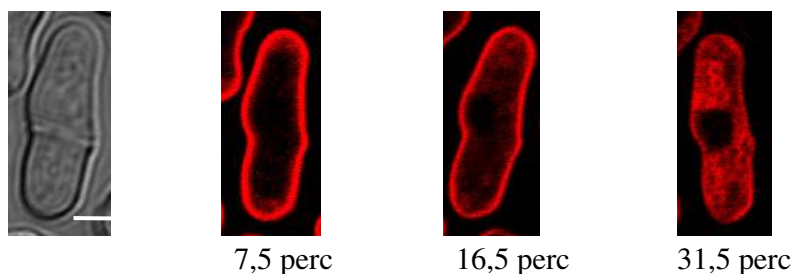


Figure 4. FM4-64 internalization of the bipolarly growing yeast cells of *S. japonicus*. Bar: 4 μ m.

This endocytosis marker has been used for *S. pombe* yeast cells. From these experiments we concluded that the pattern of the uptake in the two *Schizosaccharomyces* species are spatially the same, but because of the

difference in the cell size it is different in a timely manner: from one step to another takes more time in case of *S. japonicus*. The characteristically strong dye accumulation in the monopolarly growing tip cells of *S. japonicus* hyphae is probably due to the active membrane transport, reported in case of the filamentous fungi. Studies on the growth polarisation defective mutants proved that the uptake of the dye is cell polarity dependent.

2.4. Genes playing important role in yeast-mycelium transition of *S. japonicus* and *S. pombe*

In order to reveal the genes playing important role in yeast-mycelium transition of *S. japonicus* we isolated mutants defective in the morphology transition (myc^-). After the recombination analysis of the mutants we identified 6 novel myc^- genes, which required for the initiation of the *S. japonicus* hyphal growth. The characteristic morphological traits fell into three categories: sep-like, round and short cells (Figure 5.).



Figure 5. Yeast cell morphology in the logarithmic phase cultures of *S. japonicus* wild type (7-1) and mutant strains. (1) wild type strain (2) characteristic microhyphae in the exponential growing culture of the 7-63 mutant (3) short and round yeast cells of the 7-148 mutant. Bar: 3 μ m.

According to our results the dimorphic transition of *S. japonicus* assisted by cytological changes. These changes were examined by differential interference contrast microscopy and fluorescence microscopy. The defects

identified in the different mutant groups suggested that actin distribution, vacuole fusion and cell separation are very important events during yeast-mycelium transition.

The osmotic stress response of *S. japonicus* *myc*⁻ mutants was tested on media supplemented with KCl, CaCl₂, NaCl, MgCl₂ and sorbitol. The sensitivity of the mutants to the different stress conditions could highlight the genes involved in the mutations. The detected high chloride sensitivity of the 7-159 mutant may refer to the defect of the signaling pathway responsible for the stress tolerance response. The 7-176 mutant showed increased β -glucanase sensitivity. Taken together the fact that this mutant is incapable of polar extension and converting into mycelial growth, this sensitivity might be attributed to the changes in the composition of the cell wall. This conclusion was reported in case of other dimorphic fungal species.

Comparative proteomic analysis of *S. pombe* yeast and mycelial growth forms (L975 heterothallic strain) was performed and totally 149 proteins were detected from the peptid samples. Most of these proteins are involved in metabolism, stress response and protein synthesis (Figure 6.).

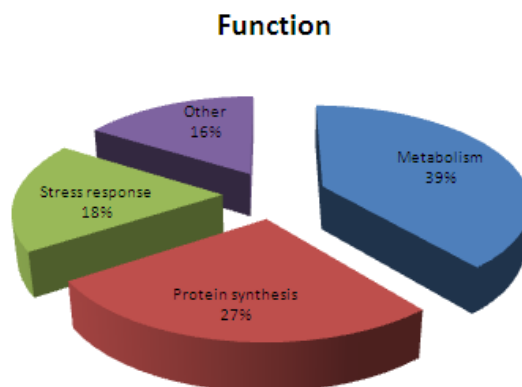


Figure 6. Protein groups based on the function of the 149 identified proteins.

Out of the 149 proteins we have identified 11 proteins, which could only be found in the mycelial sample. One of them plays a role in the TOR signaling pathway that could suggest, that via nitrogen sensing, this pathway could have an important role in the yeast-to-mycelium transition. An other protein identified only from the mycelial peptid sample could also be important in the dimorph phase transition: a conservative fungal protein. Disruption of its *Sa. cerevisiae* homologue SNO4 protein can lead to the defect in the formation of the pseudomycelium. We have identified five mitochondrial proteins could only be detected in the mycelial peptid sample. A hypothesis based on the first systematic gene disruption and overexpression analysis of *Sa. cerevisiae* filamentous growth highlights the importance of mitochondrial function during filamentous growth. Among the associated signaling pathways playing important roles in the yeast-to-mycelium transition the mitochondrial retrograde signaling pathway was identified as a key negative regulator of yeast filamentous growth.

3. References

1. Amoah-Buahin E, Bone N, Armstrong J (2005) Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Eukaryot Cell. 4: 1287-97
2. Bozsik A, Szilagyi Z, Benko Z, Sipiczki M (2002) Marker construction and cloning of a cut1-like sequence with ARS activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. Yeast 19: 485-98
3. Dodgson J, Avula H, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Hayles J, Armstrong J. (2009) Functional genomics of adhesion, invasion, and mycelial formation in *Schizosaccharomyces pombe*. Eukaryot Cell. 8:1298-306
4. Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GG (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. Cell 90: 939-49

5. Madhani HD, Fink GR (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends in Cell Biol.* 8: 348-35
6. Odds FC (1985) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol.* 12: 45-93
7. Sipiczki, M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S, Miklos I (1998a) Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology* 144: 1319-1330
8. Sipiczki M, Takeo K, Grallert A (1998b) Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology* 144: 3475-3485
9. Yanagida (2002) The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* 3: COMMENT2003.
10. Vida TA, Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol.* 128: 779-92

4. PUBLICATIONS

Articles:

1. Szilágyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M (2004) Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. *Gene.* 348:101-9
2. Enczi K, Yamaguchi M, Sipiczki M (2007) Morphology transition genes in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 92:143-54
3. Miklos I, Szilagy Z, Watt S, Zilahi E, Batta G, Antunovics Z, Enczi K, Bähler J, Sipiczki M (2007) 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: 225-38

Lectures:

1. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2002) Marker constructions in a new modelorganism in the genetical research. TDK (Debrecen)
2. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2002) Study of the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. Ann. Meeting Hung. Soc. Microbiol., Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49:395. (Balatonfüred)
3. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2004) *Schizosaccharomyces japonicus* as a new modelorganism for the genetical research. Genetical workshop in Hungary. (Szeged)
4. Szilágyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M (2004) Characterisation of two novel fork-head gene homologues in fission yeasts. Conference of the Hungarian Society on Microbiology. Abstract book p: 121 (Keszthely)
5. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2004) Investigation of the dimorphism of the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. Hungarian Day of Science. (Debrecen)
6. Sipiczki M, Enczi K (2005) Roles of the fission yeast cell wall in cell polarisation and division: a combined genetic and morphological approach. 1st International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology. Abstract book p: 974.
7. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2005) A *Schizosaccharomyces japonicus*, egy új modellszervezet a genetikai kutatások számára. VI. Conference on Genetics XIII. Conference on Cell and Developmental Biology. (Eger)
8. Kajdacs E, Enczi K, Sipiczki M (2006) Phylogenetic position of the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* according to the

recently isolated actin gene. Ann. Meeting Hung. Soc. Microbiol.,
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 53:285. (Keszthely)

Posters:

1. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2001) Investigating dimorphism of *Schizosaccharomyces japonicus*. Hungarian Day of Science. (Debrecen)
2. Sipiczki M, Bozsik A, Enczi K (2002) Cytological and genetic investigations into the regulation of dimorphism and growth polarity transitions in *Schizosaccharomyces japonicus*. VIII International Fungal Biology Conference. p: 77 (Guanajuato, Mexico)
3. Enczi K, Bozsik A, Sipiczki M (2003) Mycelial mutants in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. 1st FEMS Congress. Supplement to abstract book p: 63 (Ljubljana)
4. Miklos I, Szilagyi Z, Benko Z, Enczi K, Batta G, Sipiczki M, Bahler J (2005) Analysis of transcriptional profiles of *S. pombe sep10* and *sep15* mutant strains, which encode subunits of the Mediator complex. XXIInd Int. Conf. Yeast Genet. Mol. Biol. Yeast 22:S152. (Pozsony)
5. Miklos I, Szilagyi Z, Watt S, Zilahi E, Batta G, Antunovics Z, Enczi K, Nagy R, Szaszi E, Bahler J, Sipiczki M (2007) Transcriptional regulation in *Schizosaccharomyces pombe* cells. 15th Internat. Cong. Hung. Soc. Microbiol. Acta Microbiol Immunol. Hung. 54:83-84.