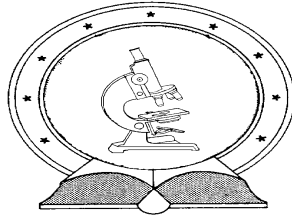


**DE TTK**



**1949**

**A gomba dimorfizmus vizsgálata: citológia és genetikai szabályozás**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

szerző neve:

Enczi Klára

témavezető neve:

Dr. Sipiczki Mátyás

DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2010.

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács, Biológiai- és Környezettudományi Doktori Iskola, a Bioreguláció Molekuláris és Fiziológiai Szerveződése és Biotechnológiai vonatkozásai programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

*Debrecen, 2010.*

*Enczi Klára  
doktorjelölt*

*Tanúsítom, hogy Enczi Klára doktorjelölt 2002-2005 között a fent megnevezett Doktori Iskola programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

*Debrecen, 2010.*

*Dr. Sipiczki Mátyás  
témavezető*

# 1 A gomba dimorfizmus vizsgálata: citológia és genetikai szabályozás

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia tudományágban

Írta: Enczi Klára  
okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Biológiai- és Környezettudományi doktori  
iskolája  
(Bioreguláció Molekuláris és Fiziológiai Szerveződése és Biotechnológiai  
vonatkozásai programja) keretében

Témavezető: Dr. Sipiczki Mátyás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. ....	.....
tagok:	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....

A doktori szigorlat időpontja: 2008. .... .

Az értekezés bírálói:

Dr. ....	.....
Dr. ....	.....
Dr. ....	.....

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. ....	.....
tagok:	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....

Az értekezés védésének időpontja: 2011. október 28.

<b>1. Tartalomjegyzék</b>	
<b>2. Bevezetés és célkitűzés</b>	<b>8</b>
<b>3. Irodalmi előzmények</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Fonalas növekedés a gombák világában</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Dimorfizmus a gombák világában</b>	<b>11</b>
3.2.1. Humánpatogén dimorf gombafajok	12
3.2.2. Növénypatogén dimorf gombafajok	13
3.2.3. Nem patogén dimorf gombák	13
3.2.4. Dimorf átalakulást befolyásoló tényezők	15
3.2.5. Citológiai változások a dimorf átalakulás során	16
3.2.6. Növekedési stratégiák	19
3.2.6.1. A fonalas forma növekedése	20
3.2.7. A dimorf átalakulás hátterében álló ismert jelátviteli útvonalak	22
3.2.8. Valódi micéliumok képzése hasadó élesztőgombák körében	24
3.2.8.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> micélium-képzése	24
3.2.8.2. A <i>S. japonicus</i> életréteklusa és micélium-képzése	25
<b>3.3. <i>S. japonicus</i> rendszertani helye</b>	<b>28</b>
<b>4. Anyagok és módszerek</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Törzsek és táptalajok</b>	<b>29</b>
4.1.1. Felhasznált törzsek	29
4.1.2. Alkalmazott tápközegek	30
<b>4.3. Kísérleti módszerek</b>	<b>32</b>
4.3.1. Klasszikus genetikai módszerek	32
4.3.1.1. Micélium-képzésben sérült mutánsok ( <i>myc<sup>-</sup></i> ) izolálása és szelektálása	32
4.3.1.2. Spórázás vizsgálata	33
4.3.1.3. Keresztezés vad típusú törzsszel: Back cross	33
4.3.1.4. Szomatikus sejthibridizáció (Protoplaszt fúzió)	35
4.3.1.5. Oktádanalízis	35



4.3.1.6. Farnezol hatása az élesztő-micélium átalakulásra	36
4.3.1.7. Acetil-szalicilsav hatása az élesztő-micélium átalakulásra	36
4.3.1.8. $\beta$ -glükánáz teszt a sejtfa szerkezet integritásának vizsgálatára	37
4.3.1.9. A mutánsaink ozmotikus és hőmérséklet érzékenységének vizsgálata	37
<b>4.3.2. Molekuláris biológiai módszerek</b>	<b>38</b>
4.3.2.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)	38
4.3.2.2. Szekvenálás és szekvencia-analízis	40
4.3.2.3. Törzsfá készítése	41
4.3.2.4. Pulzáló erőterű gélelektroforézis	42
4.3.2.5. Southern hibridizálás és detektálás	43
4.3.2.6. Fehérje extrakció	44
4.3.2.7. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis	44
4.3.2.8. Fehérjeminta előkészítése tömeg spektrometriai analízisre	45
4.3.2.9. A fehérjeminta elemzése	45
<b>4.3.3. Mikroszkópia</b>	<b>46</b>
4.3.3.1. Speciális tárgylemez	47
4.3.3.2. Fluoreszcens festések	48
4.3.3.2.1. Vakuólum festési eljárások	48
4.3.3.2.2. Sejtfa és szeptum festés	50
4.3.3.2.3. Sejtmag festés	50
4.3.3.2.4. Aktin festés	51
4.3.3.2.5. pREP41GFP plazmid felhasználása a hifasejtek megfigyelésére	51
<b>5. Eredmények</b>	<b>52</b>
<b>5.1. Micélium-képzés és citológia</b>	<b>52</b>
5.1.1. A két faj micélium-képzési stratégiája eltérő	52

5.1.2. <i>S. japonicus</i> hifái a speciális tárgylemezben	55
5.1.3. <i>S. pombe</i> hifái a speciális tárgylemezben	57
5.1.3.1. Köteges („rope”) szerkezet kialakulásának kezdeti lépései és micélium-képzés a csatornában	60
5.1.4. Vakuólumok a <i>S. pombe</i> hifasejtjeiben	62
5.1.5. Vakuólum típusok a <i>S. japonicus</i> hifasejtekben	63
5.1.6. A <i>S. japonicus</i> vakuólumainak vizsgálata fluoreszcens festékekkel	64
<b>5.2. Endocitózis</b>	<b>67</b>
5.2.1. Endocitózis a <i>S. japonicus</i> sejtekben	67
<b>5.3. Farnesol hatása az élesztő-micélium átalakulásra a <i>S. japonicus</i>-nál</b>	<b>70</b>
<b>5.4. Acetil-szalicilsav (aszpirin) hatása az élesztő-micélium átalakulásra a <i>S. japonicus</i>-nál</b>	<b>71</b>
<b>5.5. <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> micélium-képzésben sérült mutáns törzseinek izolálása, genetikai analízise és jellemzése</b>	<b>73</b>
5.5.1. <i>S. japonicus</i> morfológiai mutáns törzsek izolálása	73
5.5.2. Keresztezés vad típusú törzssel: Back cross	74
5.5.3. Rekombinációs analízis	75
5.5.4. Micéliális mutánsok sejttani jellemzése	83
5.5.4.1. Az élesztősejtek alakjában bekövetkezett változások	83
5.5.4.1.1. Sep-szerű növekedés	84
5.5.4.1.2. Kerek sejtek	87
5.5.4.2. Spórázás képességének tesztelése	90
5.5.4.3. Sejtfal szerkezet integritása	92
5.5.4.4. Mutáns törzseink ozmotikus és hőmérséklet-érzékenysége	93
<b>5.6. Proteomikai vizsgálatok <i>S. pombe</i> élesztő és micéliális fázisban lévő tenyészetein</b>	<b>95</b>
<b>5.7. Kiegészítő eredmények: módszerfejlesztések</b>	<b>99</b>

5.7.1. <i>S. japonicus</i> aktint kódoló génjének izolálása, kromoszómáinak elkülönítése és kromoszómaszámának meghatározása	99
<b>6. Eredmények megbeszélése</b>	<b>106</b>
<b>6.1. Micélium-képzés összehasonlítása a két <i>Schizosaccharomyces</i> fajnál</b>	<b>107</b>
6.1.1. A micélium-képzés gyorsasága	107
6.1.2. Micélium-képzési stratégiák	109
6.1.3. Vakuólumok szerepe a hifa növekedésben	110
<b>6.2. Az endocitózis nyomon követése a <i>S. japonicus</i> sejtjeiben</b>	<b>111</b>
<b>6.3. A <i>S. japonicus</i> 7-1 élesztő-micélium átalakulását befolyásoló vegyületek</b>	<b>113</b>
<b>6.4. A <i>S. japonicus</i> és a <i>S. pombe</i> morfológiai átalakulásában szerepet játszó gének</b>	<b>115</b>
<b>7. Összefoglalás</b>	<b>128</b>
<b>8. Summary</b>	<b>133</b>
<b>9. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>138</b>
<b>10. Irodalomjegyzék</b>	<b>139</b>
<b>11. Függelék</b>	<b>156</b>
11.1. Mellékletek	156

## 2. Bevezetés és célkitűzés

A dimorfizmus ismert jelenség a növények és az állatok világában. Az eukarióta mikroorganizmusok között is több példát találhatunk a kétalakúságra. Az Ascomycota *Candida albicans*, vagy a Zygomycota *Mucor racemosus* a legkorábban megfigyelt és leírt dimorf gombafajok között szerepel (pl. Scherr és Weaver, 1953, Bartnicki-Garcia, 1963). A két alak esetükben az unicelluláris és a fonalas alak. A dimorf gombák jellemzője, hogy különböző környezeti tényezők indukáló hatására képesek e két forma közötti (legtöbbször reverzibilis) átalakulásra.

A patogén gombák körében gyakori ez a képesség. A folyamatot kiváltó tényezők, a háttérben lejátszódó molekuláris biológiai folyamatok ezért igen nagy érdeklődést váltottak ki és váltanak ki ma is, hiszen a róluk nyert információk révén közelebb juthatunk a gombás megbetegedések gyógyításához.

A dimorfizmus komplex folyamat, amely környezeti szignálok eredményeként a sejt működésének jelentős megváltozásához vezet. Megismerésével információt nyerhetünk az eukarióta sejt differenciálódásáról is.

Napjainkig több dimorf gombafaj szisztematikus vizsgálatát végezték el: így a már említett humán patogén *C. albicans*, a növény patogén *Ustilago maydis*, vagy a nem patogén, sarjadzó élesztő *Saccharomyces cerevisiae*. E fajok vizsgálata révén több az élesztő-micélium átalakulás mögött álló konzervatív morfogenetikai folyamatról számoltak már be. Vannak azonban csak az egyes fajoknál megfigyelhető egyedi jellegek. Ezért a jelenség minél átfogóbb megismerésének, megértésének érdekében további dimorf gombafajok tanulmányozására van szükség.

A Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén folyó dimorfizmus kutatás egyik modellszervezete az Ascomycota

*Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*, egy olyan mikroorganizmus, amely kiválóan alkalmas az egysejtű alakból (élesztő) - fonalas alakba (micélium) történő átalakulás tanulmányozására, hiszen rendelkezik a patogén gombáknál megfigyelhető dimorf ciklussal: az élesztősejtekből szilárd táptalajon, 7-14 nap elteltével gombafonalakból álló valódi micélium alakul ki (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b). Jól alkalmazható modellszervezetnek bizonyult a dimorf átalakulást kísérő citológiai folyamatok, a sejtvezeték struktúrák és a sejt polaritás változásának kutatásában is. Szemben a patogén dimorf gomba fajokkal a hifák megjelenése e fajnál a tápanyagban gazdag területek elérését biztosítja, tehát nem patogén, a vele folytatott munka az egészségre veszélytelen. Előnyös tulajdonságai között szerepel, hogy haploid genomja révén minden genotípusos változás a fenotípusban is megjelenik. 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. A két faj párhuzamos vizsgálata további adatokkal szolgálhat mind a dimorfizmus, mind pedig a genusz megismerésében.

Célunk a dimorfizmusról rendelkezésre álló kutatási eredmények bővítése volt a *S. japonicus* és a *S. pombe* vizsgálata által. Ezáltal egy komplexebb képet alkothatunk erről az intenzíven kutatott egészségügyi és gazdasági szempontból is fontos jelenségről. A két fajt, mint jól kezelhető genetikai kísérleti alanyokat felhasználva céljaink szerint azonosíthatjuk az átalakulást kísérő citológiai változásokat és a bennük részt vevő géneket. A további kutatások révén pedig lehetőség nyílik arra, hogy megállapítsuk az adott gének homológjai patogén fajokban milyen hatást gyakorolnak a dimorf

átalakulásra és a virulenciára. Ezáltal a folyamatban résztvevő gének és az általuk kódolt fehérjék leendő terápiás célpontokká válhatnak.

Céljainkat a következő kísérletekkel kívántuk elérni:

- A dimorf átalakulások morfológiai és élettani összehasonlítása a *S. pombe* és *S. japonicus* között
- A dimorfizmusban részt vevő gének identifikálása mutánsok izolálásán és proteomikai vizsgálatokon keresztül
- Módszerfejlesztés: A *S. japonicus*-ról rendelkezésre álló molekuláris biológiai technikák és információ bővítése érdekében

### 3. Irodalmi előzmények

#### 3.1. Fonalas növekedés a gombák világában

A gombák körében gyakori fonalas növekedés a mikroorganizmusok számára táplálékot jelentő források: növényi, állati szervezetek és a talaj tápanyagban gazdag részeinek gyors elérését szolgálja. A gombafonalak csírázó spórákból, sejtekből, vagy már meglévő fonalakból (elágazások révén) alakulnak ki. Ezeket a hosszú, tubuláris alakú szerkezeteket hifáknak nevezzük. A növekedés során az elágazó hifák az újabb fonalakkal együtt hálózatot, gombafonal szövedéket hoznak létre, amit micéliumként ismerünk (van der Valt és Yarrow, 1984).

A **fonalas gombák** enzimek, antibiotikumok, gyógyszer alapanyagok termelése révén jelentős szerepet töltenek be a gazdaságban. A rengeteg lehetőség közül példaként megemlíthetjük a glükóamilázt (*Aspergillus niger*), penicillint (*Penicillium chrysogenum*) (pl. Vandersall és tsi, 1995, Brakhage, 1998). Másrészt a kibocsátott mikotoxinok révén nagy károkat is okoznak. Ismét a felsorolás teljessége nélkül megemlíthetünk példákat, mint az aflatoxinok (*A. flavus*), citrinin (*Penicillium* és *Aspergillus* fajok) (pl. Bennett és Klich, 2003).

#### 3.2. Dimorfizmus a gombák világában

A **dimorf gombák** a többsejtű hifákból álló valódi micéliális alak mellett unicelluláris formában is megfigyelhetőek. Ennek a két megjelenési formának köszönhető elnevezésük is. Gyakran egy harmadik fonalas alak a pszeudomicélium is azonosítható fejlődésük során. Bár mind a pszeudomicéliumot, mind a valódi micéliumot alkotó hifák hosszabb, fonalas struktúrák, mégis több, fontosabb tulajdonságban eltérnek egymástól (van der Valt és Yarrow, 1984). A **pszeudohifát** hosszúkás, egyedi sejtek láncolata

építi fel, amelyek a sejtosztódás után a sejtszeparáció hiányában együtt maradnak. Általában a táptalaj felszínén nőnek. A szeptumok mentén befűződéseket láthatunk. A **valódi hifák** ezzel szemben olyan elágazó fonalas cső-szerű struktúrák, melyek egyenes, általában invazív növekedésűek és valódi szeptumok tagolják.

A patogén gombák esetében az átalakulás, nemcsak a megjelenési forma, hanem az életmód megváltozásával is jár. A szaprofita egysejtű vagy fonalas alakból (ez fajonként változó), parazita egysejtű, vagy fonalas alak jön létre (Howard, 1962). E tulajdonság lehetővé teszi számukra a gazdaszervezetekbe való bejutást, alkalmazkodást az adott környezethez és a sikeres „tápanyagszerzést”.

A nem patogén fajok esetében a fonalas alak kialakulása a tápanyagban gazdag távolabb eső területek elérését teszi lehetővé: például a *S. japonicus* esetében (Sipiczki és tsi, 1998a).

### **3.2.1. Humánpatogén dimorf gombafajok**

A *C. albicans* az egyik intenzíven kutatott humánpatogén, dimorf gombafaj. A normál mikroflóra tagjaként megtalálható az emberi emésztőrendszerben. A szervezet immunrendszerének állapotától függően változó súlyosságú fertőzések (a bőrgombásodástól a letális szisztémás megbetegedésekig) kórokozója lehet (pl. Odds, 1994, Dupont, 1995, Weig és tsi, 1998). Több patogénnel ellentétben, amelyek egy meghatározott virulencia faktorral rendelkeznek (pl. *Clostridium tetani*), a *C. albicans* esetében számos faktort tartanak számon, amely a betegség kialakulásához vezet. Megtapadás (adherencia), csírázás, enzimtermelés és a morfológiai váltás, azaz a sarjadzó élesztő és a fonalas alak közötti reverzibilis átalakulás képessége, mind hozzájárul a virulenciához. Ez utóbbi átalakulás a patogenezis igen fontos lépése, hiszen azok a mutánsok, melyek az



átalakulásra nem képesek akár avirulensek is lehetnek (Odds, 1985, Lo és tsi, 1997, Gale és tsi, 1998, Jackson és tsi, 2007). A már felsorolt morfológiai alakok mellett megfigyelhető egy harmadik alak az ál-vagy pszeudohifa kialakulása is (pl. Molero és tsi, 1998, Sudbery és tsi, 2004).

A hisztoplazmózis kórokozója a szaprofitaként a talajban, 25°C-on fonalas növekedést mutató *Histoplasma capsulatum* egy alkalmas gazdában, 37 C°-on sarjadzó gombasejteket képez, ez utóbbi a patogén forma (Mareska és Kobayashi, 1989). Ez a hőmérséklet indukálta átalakulás jellemzi a *Paracoccidioides brasiliensis*-t és a *Coccidioides immitis*-t is (Brummer és tsi, 1993, Stevens, 1995).

### **3.2.2. Növénypatogén dimorf gombafajok**

Számos növénypatogén gomba is dimorf. Közülük csak két példát említünk meg. A kizárólag kukoricán élősködő *U. maydis* nem patogén, haploid sejtjeinek fúziójával (megfelelő párosodási típusok esetén) jönnek létre azok a patogén dikarion hifák, amelyek a kukorica minden zöld részén, levelén, csövén, címerén spórákkal töltött, óriási tumorok kialakulását indukálják (pl. Bolker, 2001, Ruiz-Herrera és tsi, 1995). A szilfavész nevű betegséget a *Ceratocystis ulmi* nevű dimorf gombafaj okozza (Hornby és tsi, 2004).

### **3.2.3. Nem patogén dimorf gombák**

A dimorfizmus kutatásában nagyon fontos szerepet játszanak a betegséget nem okozó di- és polimorf gombafajok. Ezek ugyanis „veszélytelen” modell szervezetként szolgálhatnak az információgyűjtés során.

A *Sa. cerevisiae* diploid sejtjei nitrogén éhezés hatására megváltoztathatják növekedési mintázatukat: az ovális, unicelluláris

élesztősejtek sarjadzással leánysejteket hoznak létre, melyek megnyúlnak és osztódásukat követően újabb leánysejteket kapunk. Ennek a folyamatnak a többszöri ismétlődése következtében egymáshoz lazán kapcsolódó, megnyúlt sejtek láncolata jön létre, befűződésekkel a szeptumok mentén. Az így kialakult álmicéliumot (pseudomicéliumot) alkotó fonalak unipoláris sarjadzási mintázatot követnek (Kron és tsi, 1994).

Az invazív növekedést ennél a fajnál haploid törzsek esetében is megfigyelték. Haploid MATa párosodási típusú törzs feromon hatására invazív, fonalas növekedést mutat: a sarjadzó leánysejtek az anyasejttől távolabb eső végükön újabb leánysejtet hoznak létre, míg az anyasejt maga is újabb leánysejtet hoz létre az ellenkező oldalon. Ez az ún. bipoláris sarjadzás (Erdman és Snyder, 2001).

A *Yarrowia lipolytica* számos metabolit szekréciója miatt (pl. citromsav, lizin) gazdasági jelentőséggel bíró dimorf gomba. Vad típusú törzsének tenyésztésében élesztősejtekkel, pseudohifákkal és valódi hifákkal találkozhatunk. Ez utóbbiakat szeptumok tagolják és a hifasejteken belül egy sejtmag található (Barth és Gaillardin, 1997).

A hasadó élesztő *S. japonicus* szintén rendelkezik élesztő sejtekkel jellemezhető unicelluláris alakokkal és fonalas formával (pseuso- és valódi micélium). A micélium kialakulásának elsődleges feltétele a szilárd táptalaj. Komplet táptalajon, 30°C-on, 14 nap elteltével szépen kifejlődött sugárirányban növekvő micélium látható a telep körül. A folyamatot a nitrogén gradiens irányítja (Sipiczki és tsi, 1998a). Napjainkban a University of Sussex egyik kutatócsoportja dolgozik a másik hasadó élesztő, a *S. pombe* fonalas alakjának megfigyelésével, amelyet két cikkükben is megjelentettek (Amoah-Buahin és tsi, 2005, Dodgson és tsi, 2009).

### 3.2.4. Dimorf átalakulást befolyásoló tényezők

Már Pasteur is megfigyelte, hogy *Mucor* fajok aerob környezetben (például a kenyér felszínén) filamentózus növekedést mutattak, míg anaerob viszonyok között különálló sejteket látott a mikroszkópja alatt (Orlowski, 1991). A 1. táblázatban is látható, hogy a hőmérséklet, oxigén tenzió, CO<sub>2</sub> koncentráció, pH, a nitrogén koncentráció, a hasznosítható szerves nitrogénforrás elősegítheti, vagy gátolhatja az átalakulást.

#### 1. táblázat: A dimorf átalakulást befolyásoló tényezők

<sup>1</sup>: példák a dimorf átalakulást kiváltó tényezőkre a teljesség igénye nélkül

Dimorf faj neve	Dimorf átalakulást kiváltó tényező(k) <sup>1</sup>	Az átalakulás iránya	Irodalmi hivatkozás
<i>M. racemosus</i>	anaerob környezet, magas CO <sub>2</sub> koncentráció, alacsony pH, cAMP magas szintje,	elősegíti az unicelluláris alak kialakulását	Orlowski, 1991
<i>C. albicans</i>	szérum, 37°C hőmérséklet, semleges pH,	elősegíti a fonalas forma kialakulását	Shepherd és tsi, 1980, Molero és tsi, 1998
<i>Sa. cerevisiae</i>	N-éhezés	elősegíti a fonalas forma kialakulását	Gimeno és tsi, 1992
<i>Y. lipolytica</i>	N-éhezés	gátolja a fonalas forma kialakulását	Szabo, 1999
<i>H. capsulatum</i> <i>P. brasiliensis</i>	hőmérséklet változás (25-37°C)	elősegíti az unicelluláris alak kialakulását	Mareska és Kobayashi, 1989 Brummer és tsi, 1993
<i>S. pombe</i>	N-éhezés, szilárd táptalaj	elősegíti a fonalas forma kialakulását	Amoah-Buahin és tsi, 2005
<i>S. japonicus</i>	N-éhezés, szilárd táptalaj	elősegíti a fonalas forma kialakulását	Sipiczki és tsi, 1998a

A dimorf átalakulást fajonként természetesen nemcsak egy tényező alakítja. Több feltételnek kell egyszerre teljesülnie ahhoz, hogy a kerek, ovális, vagy hosszúkás, egyedi sejtekből fonalas forma alakuljon ki. Ez természetesen az ellenkező irányban lejátszódó folyamatra is igaz.

### 3.2.5. Citológiai változások a dimorf átalakulás során

A *S. japonicus* élesztő sejtjei folyékony táptalajban tenyésztve könnyen hozzájutnak a számukra fontos tápanyagokhoz. Azonban szilárd táptalajon ez a szabály nem érvényesül, a telepeket alkotó unicelluláris sejtek lassan érik el a távolabb található, tápanyagban gazdag területeket. A *S. japonicus* a gyorsabb növekedést, a tenyészet életben maradását, hifái segítségével éri el. A hifák növekedési rátája 12-30-szorosnak bizonyult élesztősejtjeihez képest. Bár az élesztősejtek mindkét végükön egyaránt növekednek, a hifák pedig unipolárisan (csak az egyik vég növekszik), a számok mégis azt bizonyítják, hogy az utóbbi mód a sikeresebb. A két forma közötti alapvető különbség a sejtek polaritásából adódik (Sipiczki és tsi, 1998a).

Az élesztő-micélium átalakulás egyik elsődleges, legfontosabb lépése a **sejtpolaritás megváltozása**. Míg a sarjadzó élesztők unicelluláris, ovális-kerek sejtjei apikális és izotróp növekedési szakaszokon mennek keresztül és a hasadó élesztők hosszúkás sejtjeinek növekedése a sejt fejlődési állapotától függően unipoláris (pre-NETO), vagy bipoláris lehet (post-NETO) (Mitchinson és Nurse, 1985). Addig az élesztő-micélium átalakulás eredményeként kialakuló hifákban, hasonlóan a fonalas gombák hifáihoz, a növekedés az apikális végre összpontosul, vagyis unipoláris (pl. Gow, 1994, Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b, Harris és Momany, 2004, Steinberg, 2007).

A folyamat a *S. japonicus* sejtjeiben jelentős **vakuolarizációval** és aszimmetrikus sejtosztódással párosul. A citoplazmában jelen lévő kisebb

vakuolumok fúziójával a sejt térfogatának nagy részét kitevő vakuólum alakul ki. A poláris helyzetű kompartmentet tartalmazó sejt osztódását követően egy rövidebb, a citoplazmában gazdag leánysejt és egy citoplazma másik felét és az óriás vakuólumot hordozó utódsejt alakul ki. A szeptum az élesztősejtekkel ellentétben nem a sejt, hanem a citoplazmával kitöltött terület középvonalában alakul ki. A citokinezis a szeptum képzéssel befejeződik. Nem követi a szeptum felhasadása, vagyis a sejtek nem válnak szét. A kisebb, apikális sejt lesz a hifa csúcsejtje, amely tovább növekszik, majd a korábbiakhoz hasonlóan aszimmetrikusan osztódik. A szubapikális sejteket mindkét végükön szeptumok határolják. Számukra a további növekedést, egy újabb növekedési pólus, az elágazások létrehozása biztosítja (Sipiczki és tsi, 1998a).

A **citoszkeleton** alapvető szerepet játszik a sejtalkotók pozíciójának meghatározásában és irányított transzportjában, ezáltal a dimorf átalakulásban, a sejt polaritás kialakításában. Az élesztő és a hifa sejtekben egyaránt megfigyelhető **F-aktin** foltok polárisan a növekvő végeken és az osztódó sejtekben a szeptum kialakulásának helyén halmozódnak fel. A *C. albicans* hifájának növekedési periódusában kizárólag a hifacsúcs az, ami növekszik, az aktin is itt figyelhető meg (Hazan és tsi, 2002). A *Sa. cerevisiae* pszeudohifáinak sejteiben az aktin elrendeződése monopoláris, a növekvő végre korlátozódik (Cali és tsi, 1998). *S. pombe* és *S. japonicus* élesztő sejteiben egyaránt megfigyelték az F-aktin poláris, bipoláris elrendeződését (Marks és Hyams, 1985, Sipiczki és tsi, 1998b). A *S. japonicus* hifáiban az aktin a növekvő végen figyelhető meg (Sipiczki és tsi, 1998b).

A sejt váz alkotók között a poláris növekedés kialakításában a **mikrotubulusok** is fontos szerepet játszanak. A *S. japonicus* hifasejteiben megfigyelhető mikrotubulusok például hosszabbak, mint az élesztősejtekben,

pedig nem jutnak el a meghosszabbodott sejt mindkét pólusáig, hanem az óriás vakuólumok közelében végződnek. A mikrotubulusok és vakuólumok így vezethetnek a sejtorganellumok aszimmetrikus elrendeződéséhez, az aszimmetrikus sejtosztódáshoz, valamint az egyik sejtvég növekedésének leállításához és az unipoláris növekedéshez (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b). A *S. pombe* mikrotubulusokhoz kapcsolt markereket kódoló génjeinek (*tea2*, *mal3*, *tip1*, *tea1*, *tea4*) diszrupciója után, a micéliális növekedést indukáló körülmények között, a mutáns tenyészetekben abnormális filamentumok alakultak ki (Dodgson és tsi, 2009).

Az eukarióta sejt növekedésének és differenciálódásának hátterében a vezikulumok transzportja áll. Ez a folyamat magában foglalja az exocitózist és **endocitózist** (Fisher-Parton és tsi, 2000). A sejtmembránon keresztül történő anyagfelvételt endocitózisnak nevezzük. Az endocitotikus membrántranszport a plazmamembrántól a lebontásért felelős kompartmentig tart; a lizozómáig az állati sejtekben és a vakuólumig a gomba és növényi sejtekben (Geli és Riezman, 1998). *Sa. cerevisiae*-ben a vakuólumok a legnagyobb kiterjedésű organellumok (a sejtek térfogatának egynegyedét teszik ki), melyeknek legfontosabb feladatai az elsődleges és másodlagos metabolitok tárolása, szállítása, a makromolekulák emésztése és a citoszol pH-jának fenntartása (Klionsky és tsi, 1990). Az endocitózis a membrántranszport révén jelentős szerepet játszik a tápanyag felvételben, membrán receptorok szabályozásában, transzporterek és ioncsatornák, valamint membránok újrahasznosításában, ezáltal fontos szerepet tölt be a hifák apikális növekedésében (Fisher-Parton és tsi, 2000, Peñalva, 2005).

Élő sejtek festésére alkalmas membránselektív fluoreszcens festéket a membrán internalizáció követésére Vida és Emr (1995) használta először a *Sa. cerevisiae* sejtjeiben folyó endocitózis kutatása során. Az FM4-64 (amfifil jellegű, azaz hidrofil és hidrofób részt is hordoz) útja a membránba

épülve az endocitózis útvonalát követi: elsődlegesen az élesztő sejtek plazmamembránját, aztán a citoplazmatikus kompartmentek membránját (korai és késői endoszómák), végül a vakuólum membránt teszi láthatóvá. Mivel az FM4-64 csak kis mértékben toxikus és a többszöri megvilágítás után is jól detektálható, a festék segítségével az endocitózis útvonalát fluoreszcens mikroszkóppal, élő sejtekben is könnyen nyomon követhetjük (Vida és Emr, 1995).

A *Sa. cerevisiae*-t követően, a festék segítségével fonalas gombák hifáiban (*Neurospora crassa*, *A. nidulans*, *Magnaporthe grisea*) is megfigyelték az endocitotikus folyamatokat, melyek érdekessége, hogy segítségükkel az apikális és a hifacsúcs mögött lévő kompartmentekben lejátszódó membrántranszportról is képet kaphattunk (Fisher-Parton és tsi, 2000, Atkinson és tsi, 2002, Peñalva, 2005). A hifacsúcsban a plazmamembrán és a korai endoszómák után a Spitzenkörperként ismert organellumkomplex is láthatóvá vált, melynek központi jelentősége van a poláris hifa növekedésben a szekréción vezikulumok irányítása révén. A *C. albicans*-t vizsgálva annak hifáiban szintén megtalálták ezt a komplexet, melynek poláris növekedésben betöltött szerepét a sejtekben és pszeudohifákban a polariszóma látja el (Crampin és tsi, 2005).

Hasadó élesztőgombák endocitózisának vizsgálatát először *S. pombe*-ban tanulmányozták. A kapott adatok a *Sa. cerevisiae* esetében kapott eredményeket támasztották alá. Az eltérések a festék felvételének gyorsaságában és arányában mutatkoztak (Gachet és Hyams, 2005).

### **3.2.6. Növekedési stratégiák**

A különböző gombafajok eltérő stratégiát használhatnak a hifák növekedése során, de eltérhet egy dimorf gombafaj unicelluláris és fonalas formájának növekedési stratégiája is.

Különbséget találunk például a *Sa. cerevisiae* unicelluláris élesztősejtjei és a pszeudohifáit alkotó megnyúlt sejtek növekedése között. A *Sa. cerevisiae* élesztő sejtjei aszimmetrikusan osztódnak, egy kisebb méretű leánysejt fűződik le az anyasejtről. Az anyasejt rögtön újabb sarjadzásba kezd, míg a leánysejt a kritikus méret eléréséig a sejtciklus G1 fázisában növekszik. Ennek eredményeképpen az anya és leánysejtek aszinkron sarjadzanak. Ezzel szemben a *Sa. cerevisiae* pszeudohifáinak leánysejtjei szinkron növekednek (Gimeno és tsi, 1992): a pszeudohifák sejtjei szimmetrikusan osztódnak addig visszatartva a mitózist, amíg a sarj az anyasejt méretét el nem éri. Így az anya és a leánysejt a következő ciklusban egyszerre sarjadzik, kihagyva a G1-es növekedésből adódó idővesztést. A sejtciklus során így nem a G1/S, hanem a G2/M átmenet és szabályozása válik hangsúlyossá (Kron és tsi, 1994).

### **3.2.6.1. A fonalas forma növekedése**

A gyors növekedés egyik stratégiájának kulcsfontosságú szereplői a vakuólumok. Mint az alábbi példák is mutatják a vakuólumok a gyors és hatékony hifa növekedés elemei is lehetnek:

A *C. albicans* élesztősejtjei és pszeudohifái hasonlóak a *Sa. cerevisiae* élesztősejtjeihez és álhifáihoz, alak, méret és a sejtciklus eseményeinek bekövetkezésének sorrendjében (Sudbery és tsi, 2004). A hifák növekedése azonban eltér a másik két alaktól. A fonalak a citoplazma térfogatának minimális növelésével, a lehető legkevesebb energia felhasználása révén növekednek (Gow és Gooday, 1982, 1987, Barelle és tsi, 2003). A hifa a növekedése során több vakuólumban gazdag hifasejtet hagy a háta mögött, melyek létrehozása a citoplazma képzéssel szemben igen gazdaságos. A hifák apikális sejtjei kevés vakuólumot, de annál több citoplazmát örökölnek, metabolikusan igen aktív szerepet töltenek be (Barelle és tsi, 2006). Míg a



szubapikális kompartmentek leginkább csak vakuólumokat tartalmaznak. Kedvező körülmények között a vakuolizált sejtek citoplazmát szintetizálnak, majd elágazásokat alakítanak ki. Minél több vakuólumot hordoz a szubapikális sejt, annál később következik be az új elágazás kialakulása (Gow, 1994, Barelle és tsi, 2003). A *C. albicans* aszimmetrikusan osztódó, valódi hifáiban összefüggést találtak a sejtciklus és a vakuoláris állapot között. A jórészt vakuólumot tartalmazó szubapikális kompartment a sejtciklus G1-es fázisában reked, amíg az apikális sejt várakozás nélkül újabb sejtciklusba kezd, így a sejtciklus az apikális és szubapikális sejtek között aszinkronná válik (Barelle és tsi, 2003).

A fitopatogén *U. maydis* haploid sejtjeinek fúziójával dikarion hifák jönnek létre. A fonalak megnyúlása a citoplazmát tartalmazó binukleáris csúcssejt növekedése révén valósul meg, hátrahagyva az óriás vakuólumokat tartalmazó üres, távoli sejteket (Steinberg és tsi, 1998). Az óriás vakuólumok a csúcssejt nem növekvő végén alakulnak ki, a későbbiekben ezek bazális helyzetű vakuólumok alkotják a szeptummal elválasztott üres, távoli kompartmenteket.

A *S. japonicus* hifasejtjeiben kialakult óriásvakuólumok is a gazdaságos, gyors növekedést szolgálják, valamint a poláris helyzetük révén elősegíthetik az így kijelölt vég növekedésének megállását (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b).

Gyors hifa növekedésre találhatunk példát a vakuólumok igénybevétele nélkül is. Például a fonalas gomba *A. nidulans* hifáinak csak az apikális sejtjei növekednek (akár 50 sejtmag is lehet ebben a kompartmentben). A csúcssejt mögötti régióban egymással közel azonos méret jellemzi a nyugalomban lévő hifasejteket, azokon belül meghatározott, 3-4 sejtmag számmal. Ezek a sejtek már nem növekszenek, aktivitásukat csak

elágazások létrehozásával nyerik vissza (Kaminskyj és Hamer, 1998, McIntyre és tsi, 2001).

### **3.2.7. A dimorf átalakulás hátterében álló ismert jelátviteli útvonalak**

A *Sa. cerevisiae* esetében számos, a pszeudohifák kialakulásának hátterében álló konzervatív útvonalról és a szabályozásban részt vevő fehérjéről beszámoltak már (pl. Pan és tsi, 2000): a **MAP kináz kaskád** a haploid sejtek feromon kiváltotta párosodását és a diploid sejtek nitrogén éhezés hatására bekövetkező fonalas növekedését is szabályozza.

Ez azt jelenti, hogy a MAP kináz kaskád résztvevői két különböző válasz kiváltásáért felelős útvonal tagjai, amelyek két különböző szignált érzékelve aktiválódnak. A fonalas növekedésben résztvevő fehérjék a Ste20p, Ste11p, Ste7p, Kss1p kinázok, a Ste12p transzkripciós faktor, amely a Tec1p transzkripciós faktoralal együtt az általuk szabályozott gének promóterjeinek FRE (Filamentation and invasion Response Element) régióját felismerve szabályozzák azoknak az átírását.

A választ kiváltó szignálkaskád mellett jelentős szerepük van maguknak a MAP kinázoknak is. A Fus3p MAP kináz vesz részt a párosodás szabályozásában és gátolja az invazív növekedést, a Kss1p MAP kináz pedig az invazív és fonalas növekedést szabályozza. Amennyiben a Ste12p az Mcm1p-vel képez dimert, ez a feromon válaszban szerepet játszó gének szabályozásához vezet; míg ha a Tec1-gyel képez dimert, a diploid sejtek fonalas alakjának kialakulásában részt vevő, további géneket szabályozza.

A szabályozásban részt vevő másik útvonal a **cAMP-függő útvonal**, amely központi szereplője a másodlagos hírvivő molekula a ciklikus adenozin monofoszfát (cAMP). Koncentrációjának jelentős szerepe van a morfológiai átalakulásban.

Számos fajnál megfigyelték, hogy a cAMP-szint csökkenése elősegíti a micéliális fázis kialakulását és fenntartását. A *S. japonicus*-szal folytatott kísérletek során, indirekt módon kimutatták a cAMP függő útvonal dimorf átalakulásra kifejtett hatását. Koffein és teofilin hatására, a cAMP foszfodiészteráz gátlása révén, magas intracelluláris cAMP szint alakult ki, amely a hifák feldarabolódását és az élesztőfázis kialakulását eredményezte. Külső forrásból származó cAMP adagolása is a hifa növekedés elmaradását, valamint a hifa-élesztő átalakulást indukálta (Sipiczki és tsi, 1998b). *M. racemosus*-szal folytatott kísérletekben kimutatták, hogy az élesztősejtekben a cAMP szint jóval magasabb, mint a hifákban, és további cAMP adagolása megakadályozza a fonalak kialakulását (Larsen és Sypherd, 1974).

A *Sa. cerevisiae*, *H. capsulatum*, *C. albicans*, *S. pombe* esetében a cAMP a korábban említett megfigyelésekkel ellentétesen hat. Mind a négy fajnál a kísérletek során kimutatták, hogy a cAMP adagolása, magas szinten tartása elősegíti a pseudohifák, hifák kialakulását (Pan és tsi, 2000, Gancedo, 2001, Medoff és tsi, 1981, Amoah-Buahin és tsi, 2005). Meg kell jegyeznünk, hogy a *Sa. cerevisiae* esetében megfigyelték, hogy a mesterségesen magasán tartott cAMP szint következtében kialakult pseudohifák tagjai kerek sejtek voltak, szemben a nitrogén éhezés hatására kialakult megnyúlt sejtek alkotta álhifákkal (Pan és Heitman, 1999).

Amíg a *Sa. cerevisiae* párosodásában elsődleges szerepet a MAP kináz kaszkád játsza, addig a *S. pombe* esetében a párosodásban a MAP kináz kaszkád (feromon érzékelés) és a cAMP-függő útvonal (tápanyag érzékelés) összehangoltan vesz részt (Pan és tsi, 2000). A fonalas alak kialakulásában szerepet játszó útvonalakról a következőket ismertük meg (Amoah-Buahin és tsi, 2005): A *S. pombe* esetében a feromon válaszban részt vevő MAP kináz (Spk1 kináz) a kutatások szerint nincs szerepe a fonalas növekedés kialakulásában; valamint a stressz válaszban szerepet játszó MAP-kináz

kaszkád vizsgált résztvevőinek (Sty1, Pmk1) egyike sem szükséges a hifa növekedéshez. Ettől eltérően a cAMP-függő útvonalnak jelentős szerepe van a *S. pombe* dimorf átalakulásában. A glükóz receptor, G protein, adenilát cikláz, a cAMP és a cAMP függő protein kináz egyaránt részt vesznek a fonalas alak kialakulásának szabályozásában.

*C. albicans* esetében a MAP kináz kaszkádnak, cAMP függő útvonalnak egyértelmű szerepét mutatták ki a dimorf átalakulás során (pl. Madhani és Fink, 1998, Lengeler és tsi, 2000, Gancedo, 2001, Monge és tsi 2006, Bahn és tsi, 2007).

A fent említett útvonalakban résztvevő fehérjéket kódoló gének mellett számos gén létezik, amelynek mutációja részben vagy egészben hifázásra képtelen mutánsokat eredményez; a fonalas forma kialakulásának hiánya pedig gyakran avirulens törzsek létrejöttét eredményezi (pl. Lo és tsi, 1997, Braun és Johnson, 2000, Saville és tsi, 2003).

### **3.2.8. Valódi micéliumok képzése hasadó élesztőgombák körében**

A *S. pombe* és *S. japonicus* fajok esetében megfigyeltek pszeudohifákat, melyek a táptalaj felszínén növekedtek és valódi hifákat, melyek invazív növekedésűek.

#### **3.2.8.1. *Schizosaccharomyces pombe* micélium-képzése**

A *S. pombe* *sep1-1* mutáns törzsének jellegzetessége, hogy a sejtosztódást követően elmarad a sejtek szeparációja, ezáltal akár 15 sejtet is tartalmazó, elágazó mikrohifa jön létre. Ezek a hifák a valódi hifákkal ellentétben megtartották bipoláris növekedésüket (Sipiczki és tsi, 1993).

A *S. pombe* vad típusú törzseinek (NCYC132, L972, L975) valódi hifa képzéséről azonban alig néhány éve, 2005-ben számoltak be (Amoah-Buahin és tsi, 2005). A vad típusú törzs micélium képzését nitrogén szegény

környezet indukálta. Speciális táptalaj kidolgozására volt szükség a hifázás vizsgálatához (LNB), amely limitált nitrogénforrás mellett, gazdag szénforrást tartalmazott. Egyéb összetevők, mint a táptalaj foszfor, vagy kén tartalmának csökkentése, vagy a szénforrás megváltoztatása (glükóz cseréje glicerinre) nem váltották ki a hifák kialakulását. A micéliumok csak szilárd táptalajon, 30°C-on jöttek létre. Az invazív növekedésű, elágazó, valódi hifák alkotta micéliumok megközelítőleg két hét elteltével alakultak ki. Ehhez hasonló hifa növekedést értek el a külső forrásból származó cAMP adagolás hatására is. A csoport munkájának újabb eredményeként 2009-ben megjelenő cikkükben beszámolnak a *S. pombe* komplett táptalajon indukált micélium-képzéséről, valamint néhány olyan génről, amely feltehetően szerepet játszik az átalakulás során (Dodgson és tsi, 2009).

### **3.2.8.2. A *S. japonicus* életciklusa és micélium-képzése**

#### *Életciklus*

A *S. japonicus* természetes körülmények között haploid, azaz egyszeres kromoszóma készlettel rendelkezik. Elegendő mennyiségű tápanyag jelenlétében vegetatív módon, kettéhasadással szaporodik, mely a sejtek előzetes megnyúlásával, ill. szeptum képződésével jár. N-szegény környezetben konjugáció lép fel. A *S. japonicus* homotallikus (mitótikus osztódásonként váltja párosodási típusát), így a sejtek egy telepen belül is párt találhatnak a konjugációhoz. Konjugáció során a sejtek összeolvadnak, majd bekövetkezik a kariogámia létrehozva a zigótát. A zigóta képviseli e faj rövid diploid állapotát. A zigóta azonnali meiózison megy keresztül, amit egy mitózis követ, ezáltal 8 db, haploid, aszkuszban ülő aszkospórát képez, melyek kedvező feltételek mellett kicsíráznak. A diploid állapot mesterségesen, szelektív körülmények létrehozásával átmenetileg fenntartható, ebben az esetben a diploid sejtek mitótikusan osztódnak.

Azonban, a zigótához hasonlóan, N-éhezés hatására ekkor is bekövetkezik a sporuláció és belépünk a már korábban ismertetett haploid sejtciklusba (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b, Bozsik és tsi, 2002).

### *Dimorf ciklus*

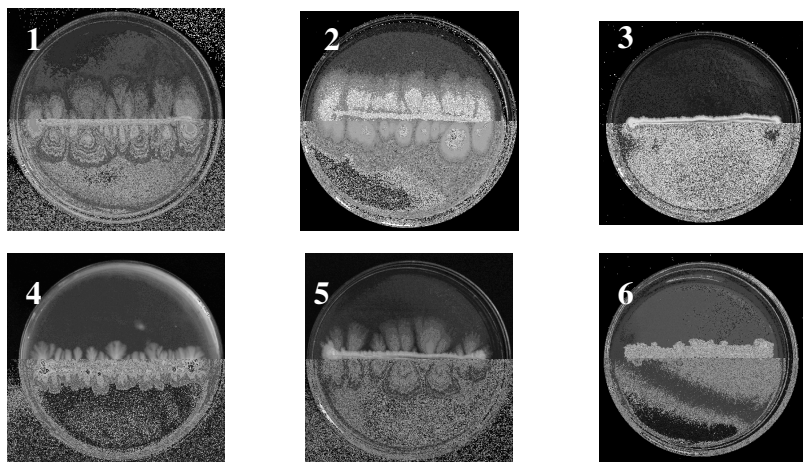
Késői exponenciális fázisban a szilárd táptalajon tenyésztett élesztősejtek mérete és alakja is eltér a kiindulási tenyészet sejtjeitől: erősen megnyúlt, szabálytalanul elgörbült sejtek, valamint többsejtes láncok láthatóak. A megnyúlt sejtekben a növekedés bipolárisról unipolárisrá válik, a sejtosztódásokat nem követi sejtszeparáció. 3-5 nappal a leoltás után a táptalaj felszínén kisebb elágazásokat tartalmazó, több sejtes pszeudohifákból álló pszeudomicélium jelenik meg, majd 8-10 nap elteltével invazív fonalakkból álló, sugárirányban növekvő, valódi micélium figyelhető meg a tenyészet körül. Az előregedett tenyészetekben a micéliumok között, a feldarabolódott hifasejtekből létrejött artrospórákat láthatunk, amelyek megfelelő körülmények között újra élesztősejteké alakulnak (Sipiczki és tsi, 1998a).

A hifák növekedését a tenyészet körül, a táptalaj tápanyagtartalmának csökkenése révén kialakult nitrogéngrádiens befolyásolja. Az élesztő-hifa átalakulás 19-35°C között, kizárólag szilárd táptalajon játszódik le. Amennyiben folyékony táptalajon tenyésztjük a *S. japonicus* vad típusú törzsét, úgy nem következik be a hifázás ill. a már kialakult hifák egysejtű élesztősejteké fragmentálódás. A dimorf átalakulás tehát az ellenkező irányban is lejátszódhat, amennyiben a környezeti feltételek megváltoznak és a sejtes formának kedveznek (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b).

Haploid sejtekből létrehozott protoplasztok fúziójával előállított diploid sejtekből, a spórázást gátló táptalajon, hosszabb inkubációs idő elteltével szintén fonalas forma fejlődik. Ez kromoszómakészletét tekintve diploid.

Ezek a hifák morfológiájukban nem különböznek haploid társaiktól (Bozsik és tsi, 2002).

A *S. japonicus* dimorfizmusát vizsgálva Bozsik és társai három monomorf, micélium-képzésre nem képes mutánst izoláltak, amelyeket a hibás gének szerint két csoportba soroltak. Egy csoportba az azonos génben érintett mutánsok tartoztak, amelyek allélikusak egymással (Bozsik és tsi, 2002). A későbbiekben két másik a vad típustól eltérő micéliumot fejlesztő csoportot is azonosítottunk (Enczi és tsi, 2003). Az azonosított morfológiai mutáns típusokat az 1. ábrán mutatjuk be.



**1. ábra** A *S. japonicus* morfológiai mutánsainak típusai. Az első sor képein (1) a vad típusú 7-1, kontrol törzs, (2) a  $myc^{++}$  és (3) a  $myc^{-}$  mutánsok láthatóak. A 4., 5. és 6. csészéképeken a  $myc^{-}$  mutánsok további három altípusa látható.

Az első csoportba a hiperaktív micélium-képző törzsek,  $myc^{++}$  tartoznak (1/2. ábra). Ezekre jellemző, hogy az azonos idő alatt a telepek körül kialakuló micélium mérete meghaladja a vad típusét. A második ún.  $myc^{-}$  csoportba a redukált micélium-képzéssel jellemezhető mutánsok sorolhatóak. Ez a  $myc^{-}$  csoport is három alcsoportra bontható, a micélium hossza és sűrűsége alapján:

- a. a micélium hossza rövidebb, mint a vad típusnál megfigyelt (1/4. ábra)
- b. a micélium hossza megegyezik a vad típuséval, de sűrűsége eltér (1/5. ábra)
- c. ritkább és rövidebb micélium a vad típushoz hasonlítva (1/6. ábra)

A harmadik csoportba tartozó törzsek esetében ( $myc^-$ ) egyáltalán nem figyelhető meg micélium-képzés (micélium negatív, 1/3. ábra).

### 3.3. A *S. japonicus* rendszertani helye

A *S. japonicus* Eriksson rendszertana (1997) szerint az Ascomycota törzsön belül a Taphrinomycotina altörzsbe sorolható. A Schizosaccharomycetes osztály egyetlen rendjének (Schizosaccharomycetales) genuszába (*Schizosaccharomyces*) négy faj tartozik: *S. pombe*, *S. octosporus*, *S. japonicus*, *S. kambucha* (Sipiczki, 2000a, Singh és Klar, 2002). A genusz legismertebb tagja a *S. pombe*, amelynek teljes genom szekvenciáját ismerjük (Wood és tsi, 2002). A *S. pombe*-nak két varietasa van: *S. pombe* var. *pombe* és *S. pombe* var. *versatilis*.

A *S. octosporus* jellegzetessége, hogy 8 askospórát képez askuszában (van der Valt és Yarrow, 1984). A *S. japonicus* szintén 8 spórás askuszokat képez, valamint jellegzetes tulajdonsága a valódi micélium-képzés (van der Valt és Yarrow, 1984). A *S. japonicus*-nak két varietasa van: *S. japonicus* var. *japonicus* és *S. japonicus* var. *versatilis*. A *S. octosporus* és a *S. japonicus* genomjának szekvenálását a Broad Intézetben végezték el ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/MultiHome.html)).

Ebben a dolgozatban két varietas-t használtunk: a *S. pombe* var. *pombe*-t és a *S. japonicus* var. *japonicus*-t, de az egyszerűség kedvéért a varietas neveket elhagytuk.



## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Törzsek és táptalajok

#### 4.1.1 Felhasznált törzsek

A doktori munka során felhasznált törzseket az 2. táblázat tartalmazza.

**2. táblázat:** A kísérleteink során használt törzsek listája

Törzskönyvi szám	Genotípus	Forrás
<b>1. <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> törzsek</b>		
7-1 CCY-44-5-1 (CBS 354)	vad típus	Yukawa és Maki, 1931 Czechoslovak Collection of Yeasts (CCY) Bratislava, Slovakia
<b>1.1. Auxotróf mutánsok</b>		
7-26	lys2-1	Bozsik és tsi, 2002
7-31	arg1-1	Bozsik és tsi, 2002
7-70	leu4-6	Bozsik Anikó
7-81	ura4-24	Bozsik és tsi, 2002
7-131	ade4-12	Bozsik Anikó
<b>1.2. Micéliumot nem képző mutánsok (myc<sup>-</sup>)</b>		
7-63	myc-4 leu1-10	Bozsik és tsi, 2002
7-96	myc 10 ura4-24	Bozsik és tsi, 2002
7-148	myc-31 ura4-24	saját izolátum
7-154	myc-34 arg1-1	saját izolátum
7-155	myc-35 leu4-6	saját izolátum
7-156	myc-36 leu4-6	saját izolátum
7-157	myc-37 ura4-24	saját izolátum
7-159	myc-39 lys2-1	saját izolátum
7-163	myc-43 arg1-1	Ádám Csaba
7-176	myc-56 ag1-1	Katkó Mónika
7-182	myc-4 ade4-12	saját izolátum
7-191	myc-34 ade4-12	saját izolátum

Törzskönyvi szám	Genotípus	Forrás
<b>2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> törzsek</b>		
L972	h <sup>-</sup> vad típus	Bern Collection, Svájc (Leupold, 1950)
L975	h <sup>+</sup> vad típus	Bern Collection, Svájc (Leupold, 1950)
NCYC 132	h <sup>90</sup> vad típus	National Collection of Yeast Cultures, Norwich, United Kingdom N.C.Y.C. 132 N.S. (Mitchison és Creanor, 1971)
1165	leu1-32	Bern Collection, Svájc (Kohli, 1976) <i>pREP41-GFP</i> plazmiddal transzformálva

#### 4.1.2. Alkalmazott tápközegek

A kísérleteink során használt tápfolyadékok és táptalajok összetételét, valamint a használt kiegészítő oldatokat a 3. és 4. táblázatok tartalmazzák (Sipiczki és Ferenczy 1977, Alfa és tsi, 1993, Bozsik és tsi, 2002, Amoah-Buahin és tsi, 2005)

#### 3. táblázat: A felhasznált tápfolyadékok és táptalajok összetétele (100ml)

<b>Tápfolyadékok</b>		
<b>YEL</b>	<b>SML</b>	<b>szSML</b>
0,5g élesztő kivonat 3g glükóz pH4,8-5,2	0,5g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05g MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O 1g glükóz 100µl sárga vitaminoldat	SML+0,8M szorbit
<b>LNB</b>	<b>EMML-N</b>	
6,7mg Yeast Nitrogen Base 1g glükóz 2ml sóoldat (50x) 100µl vitaminoldat (1000x)	0,3g C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> KO <sub>4</sub> 0,268g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12H <sub>2</sub> O 2g glükóz 2 ml sóoldat (50×) 100µl vitaminoldat (1000×) 10µl nyomelemoldat (10000×)	

<b>Táptalajok</b>				
YEA	SMA	EMMA-N	LNBA	szSMA
YEL+2 g agar	SML+2g agar	EMML-N+2g agar	LNB+2g agar	szSML+2g agar
Aminosav és nukleotid kiegészítés: 5mg/ml nukleotidbázis, vagy aminosav a törzs auxotrófiájának megfelelően				

**4. táblázat:** Kiegészítő oldatok 100ml desztillált vízben (Alfa és tsi, 1993)

Összetétel:	Sárga vitaminoldat	Vitaminoldat (1000x)
	0,2mg folsav 0,2mg biotin 200mg inozitol 40mg Ca-pantotenát 40mg niacin 40mg pyridoxin-HCl 20mg aminobenzoésav 20mg riboflavin	0,1g pantoténsav 1g nikotinsav 1g myo-inozitol 1mg biotin
Összetétel:	Nyomelemoldat (10000x)	Sóoldat (50x)
	0,5g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0,4g MnSO <sub>4</sub> 0,4g ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 0,2g FeCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O 40mg molibdénsav 0,1g KI 40mg CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O 1g citromsav	5,25g MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O 5g KCl 73,5mg CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O 0,2g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

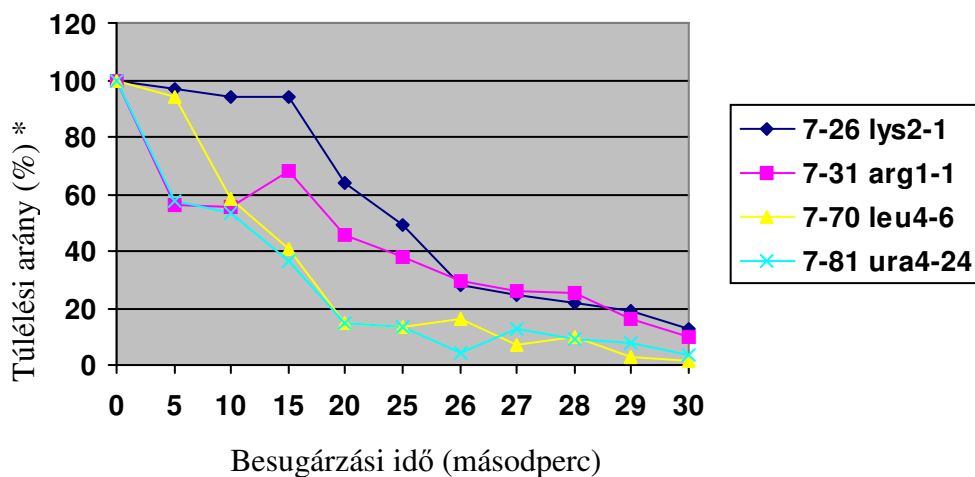
### 4.3. Kísérleti módszerek

#### 4.3.1. Klasszikus genetikai módszerek

##### 4.3.1.1. Micélium-képzésben sérült *S. japonicus* mutánsok ( $myc^-$ ) izolálása és szelektálása

Mutagenézis:

Micélium-képzésben sérült mutáns törzseket stabil auxotróf markereket hordozó törzsek (7-81 *ura4-24*, 7-26 *lys2-1*, 7-31 *arg1-1*, 7-70 *leu4-6*) logaritmusos fázisban lévő tenyészetének UV mutagenézisével állítottunk elő (2. ábra). A tenyészetből  $10^3$  db sejtet komplett táptalajra szélesztettünk, majd UV fényforrás (Cole Palmer UV lampa, 254 nm tartomány) alá helyeztük 27-30 másodpercre, mely tapasztalataink szerint a 10%-os túlélési rátát adó besugárzási dózissal felel meg.



2. **ábra** A hifa-képzésre nézve vad típusú, auxotróf törzsek (7-26, 7-31, 7-70, 7-81) irtási görbéi. Meghatározott mennyiségű ( $10^3$  db) sejtet 5, 10, 15, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30 másodperces UV besugárzásnak tettünk ki, majd megszámoltuk a túlélő sejtekből kialakult telepek számát. \*: Az UV-mutagenézisnek kitett sejtek túlélési aránya (%).

Szelekció:

A kísérletek során csészénként 1000 sejtet szélesztettünk, legalább 1000 csészét vizsgáltunk meg. Azokat a túlélő sejtekből felnövekedő telepeket, amelyek körül 14 nap elteltével sem láttunk micélium növekedést, friss, komplett táptalajra oltottuk át. Ezáltal kiszűrhattuk azokat a telepeket, amelyek körül azért nem alakult ki micélium, mert fizikailag túl közel voltak egymáshoz (Sipiczki és tsi, 1998a). A friss, komplett táptalajokra leoltott törzseket 21 napig 30°C-on inkubáltuk. Amennyiben nem láttunk a leoltott tenyészet körül micéliális növekedést, a törzset micélium negatívként (**myc<sup>-</sup>**) a laboratóriumi törzsgyűjteményben tároltuk. A kiválasztott telepek auxotrófiáját replikázással, minimál és a megfelelő aminosav vagy szerves bázis tartalmú táptalajokon vizsgáltuk.

#### **4.3.1.2. Spórázás vizsgálata**

Micélium-negatív (**myc<sup>-</sup>**) törzseink spórázási képességét 30°C-on, spóráztató táptalajon (EMMA-N), 24 óra elteltével vizsgáltuk. Kontrollként a 7-1-es törzskönyvi számú, vad típusú törzset használtuk.

#### **4.3.1.3. Keresztezés vad típusú törzssel: Back cross**

A micélium képzés szempontjából vad típusú és a micélium negatív törzsek keresztezéséből származó oktádok vizsgálatával célunk az volt, hogy megállapítsuk, hogy a **myc<sup>-</sup>** mutáns törzseink egy vagy több génben sérültek. A 7-63, 7-96, 7-148, 7-154, 7-155, 7-156, 7-157, 7-159, 7-163, 7-176 törzseket kereszteztük egy micéliumképzésre nézve vad típusú törzssel, mely auxotrófiája komplementer volt a keresztezési párral (7-80 uracil auxotrófia, 7-131 adenin auxotrófia). A keresztezéseket szomatikus hibridizációval (a módszer leírását lásd a 4.3.1.4. pontban) végeztünk. Ezzel a módszerrel elkerülhetjük azoknak a zigótikus aszkuszoknak a kialakulását és vizsgálatát,

amelyeket az ellentétes párosodási típusú, de azonos törzskönyvi számú mutánsok sejtjeinek konjugációjával jönnek létre (Bozsik és tsi, 2002). Ugyanis törzseink feltételezhetően homotallikusak, azaz osztódásonként változhat a párosodási típusuk, így sejtjeik képesek párt találni a konjugációhoz a tenyészetben belül. Ha pedig az így létrejött spórákból felnövekvő telepeket is bevonjuk az analízisbe, hibás eredményeket kaphatunk. A másik fontos érv a szomatikus hibridizáció mellett, hogy ezzel a módszerrel szexuális folyamatainkban változó mértékben sérült mutánsainkat is keresztezni tudtuk.

A fúziók termékeként kapott diploid sejteket spóráztattuk és az így kapott ún. azigótikus aszkuszkokkal dolgoztunk tovább. A zigótikus és az azigótikus aszkuszkok jellegzetes alakjuk révén könnyen elkülöníthetőek. Míg a zigótikus (sejtek konjugációjával létrejövő) aszkusz kiflihez, telefonkagylóhoz hasonló, az azigótikus aszkusz kerek, vagy hosszúkás zsák alakú (Bozsik és tsi, 2002). Ez utóbbi aszkuszkokat vizsgáltuk a továbbiakban. (Zigótikus aszkuszkok kialakulása igen kis eséllyel történhet, a létrejött spórákból kialakuló vad típusú haploid sejtek, vagy backmutált sejtek közötti párosodás és aszkuszképzés eredményeként.) Mikromanipulátorra szerelt kapilláristű segítségével, az aszkuszfal spontán felbomlása után, komplett táptalaj felületén különítettük el az egy aszkuszba tartozó spóratagokat.

Először a felnövekvő telepek auxotrófiáját teszteltük, és a továbbiakban csak azokat a diploidokat vizsgáltuk, melyek spóráiban képződő telepek között mindkét auxotróf marker megjelent, vagyis bebizonyosodott, hogy az illető diploid valóban a két szülő törzs sejtjeinek fúziójából született.

#### **4.3.1.4. Szomatikus sejthibridizáció (protoplaszt fúzió) (Sipiczki és Ferenczy, 1977)**

A módszer lehetővé teszi, hogy a hagyományos módszerrel nem keresztezhető (steril, vagy azonos párosodási típusú) sejtekből diploidot hozzunk létre. Mi az általunk használt morfológiai mutáns törzsek sterilitása és homotallikus jellege miatt (az önkonjugáció elkerülése végett) alkalmaztuk.

Az egyes törzsek exponenciális szaporodási fázisban levő sejtjeit 0,65M KCl oldattal mostuk, majd lysing enzim (L1412, Sigma) 3,5 mg/ml koncentrációjú oldatában szuszpendáltuk fel. Így 60-120 perc elteltével protoplasztokat kaptunk, melyeket 0,8M szorbit oldattal kétszer mostunk át. A második mosás után a fúzionálandó törzseket összeöntöttük, lecentrifugáltuk és 30%-os PEG 6000:0,1M CaCl<sub>2</sub> 9:1 arányú keverékében szuszpendáltuk fel. 20 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Szuszpenziókat fedőagarba (45°C-os, 1%-os agart tartalmazó szSMA) ágyazva szSMA-ra szélesztettük. 5-7 napos inkubációt követően a növekvő diploid telepeket minimál táptalajra (SMA) izoláltuk.

#### **4.3.1.5. Oktádanalízis**

A protoplaszt fúzió eredményeként kapott diploid sejteket 24 órán keresztül spóráztató táptalajon (EMMA-N) inkubáltuk. Majd steril kaccsal komplett táptalajra csíkot húztunk a jellegzetes alakú, nyolc spóras azigótikus aszkuszokat (oktádok) tartalmazó tenyészetből. Ebből mikromanipulátorra szerelt kapilláristű segítségével egy-egy aszkuszt elszeparáltunk a tenyészetből. 6-8 óra múltán az aszkuszfal spontán lízise révén a spórák kiszabadulnak, így azokat egymástól olyan távolságra húztuk ki, amely lehetővé teszi, hogy különálló telepeket képezhessenek (Bozsik és tsi, 2002). Az egy aszkuszból származó spórákból felnövekvő telepek genetikai

vizsgálata az oktádanalízis. Kísérleteink során az így nyert telepek auxotrófiáját és micélium képzési sajátosságait vizsgáltuk.

Spórák vizsgálatára alkalmas módszer még a random spóra analízis. A spóráztatás után kapott aszkuszokat tartalmazó tenyészetet  $\beta$ -glükuronidáz (Sigma, G0876) enzimmel kezeltük, amíg az aszkuszfal felbomlik és a tenyészetben található sejtek elpusztulnak. Ezt követően a már csak spórákat tartalmazó szuszpenziót komplett táptalajra szélesztettük ( $5 \times 10^2$ /csésze) és vizsgáltuk a spórákból növekvő különálló telepeket. A vizsgálatainkhoz mi mégis többnyire az előbb ismertetett módszert használtuk, mert megfigyeltük, hogy több napos enzimes kezelést követően is nagy százalékban láttunk, együtt maradó spórákat, amelyek közösen képeznek (keverék) telepeket, így téves következtetés levonásához vezethetnek. Az oktádanalízis előnye, hogy az egyetlen meiotikus osztódáson belüli szegregáció nyomon követhető.

#### **4.3.1.6. Farnezol hatása az élesztő-micélium átalakulásra (Hornby és tsi, 2001)**

A vad típusú törzs micélium képzésének érzékenységét vizsgáltuk. Farnezolt (F203, Aldrich) növekvő koncentrációban (0,025, 0,25, 0,5, 1, 5, 10 mM) tartalmazó YEA táptalajokra csík formájában leoltottuk a vizsgálandó, vad típusú 7-1-es törzset. A növekedés változását 30°C-on történő 12-21 napos inkubálás után értékeltük.

#### **4.3.1.7. Acetil-szalicilsav hatása az élesztő-micélium átalakulásra (Alem és Douglas, 2004)**

A vad típusú törzs micélium képzésének érzékenységét vizsgáltuk. Acetil szalicilsavat (A5376, Sigma) növekvő koncentrációban (1, 2, 3, 4, 5, 10 mM) tartalmazó YEA táptalajokra csík formájában leoltottuk a vizsgálandó, vad



típusú 7-1-es törzset. A vegyület savas kémhatását az agar hozzáadása előtt, a pH beállításával küszöböltük ki, így a táptalaj kémhatása nem befolyásolta a gombafonalak növekedését. A 7-1-es törzset ezekre a pH4,8-5,2 kémhatású táptalajokra oltottuk le. A növekedés változását 30°C-on történő 21 napos inkubálás után értékeltük.

#### **4.3.1.8. $\beta$ -glükánáz teszt a sejtfal szerkezet integritásának vizsgálatára**

(Grallert és tsi, 1997)

A 30C-on inkubált, YEL-ben tenyésztett logaritmikus fázisú tenyészeteket centrifugáltuk, majd desztillált vízzel mostuk. A sejteket ezek után 3,5mg/ml-es koncentrációjú vízben oldott lysing enzimmel (L1412, Sigma) kezeltük. Megadott időközönként (10, 20, 50, 70, 90, 170 perc) mikroszkóp alatt, Bürker kamrában számoltuk az életképes és az elpusztult sejtek arányát.

#### **4.3.1.9. A mutánsaink ozmotikus és hőmérséklet érzékenységének vizsgálata** (Grallert és tsi, 1999)

Micéliális mutánsainkat különböző koncentrációjú klorid-sókkal: KCl (0,3, 0,6, 0,9 M); NaCl (0,3, 0,6 M); MgCl<sub>2</sub> (0,3, 0,6, M); CaCl<sub>2</sub> (0,1, 0,2, 0,6 M) és szorbittal (0,9, 1,2, 1,8 M) kiegészített komplett táptalajokon 30°C-on inkubáltuk. A kísérletet Grallert és társai 1999-ben megjelent cikkében található leírás szerint végeztük el, cseppentéses módszerrel. Hasonló cseppentéses módszerrel vizsgáltuk mutánsaink növekedését 25, 30 és 37 °C-on.

### 4.3.2. Molekuláris biológiai módszerek

A DNS-sel végzett molekuláris biológiai módszereket Sambrook és tsi. (1989) leírása alapján végeztük.

#### 4.3.2.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

A reakció részleteit a 5. táblázat tartalmazza.

**5. táblázat** Kísérleteink során a következő reakció elegyet mértük össze *S. japonicus* szekvenciák amplifikálásához

Összetevő	Térfogat/50µl	Végkoncentráció
szűrt desztillált víz (Millipore)	35,5µl	-
PCR puffer 10x (Fermentas, B38)	5µl	1x
25mM MgCl <sub>2</sub> (Fermentas, R0971)	4µl	2mM
dNTP Mix (Fermentas, R0181)	2µl	200µM
Primer I	1µl	1µM
Primer II	1µl	1µM
genomiális DNS	1µl	10pg-1µg
Taq DNS Polimeráz enzim (EP0401)	0,3µl	1,5 unit

A PCR reakciók során különböző PCR primereket és programokat használtunk a szekvenciáink amplifikálásához.

PCR primerek:

**aktin** gén részleges szekvencia:

ActF: 5'-AGG MGG AGY AAM AAT CTT G-3'

ActR: 5'-TGS CAT CAC ACW TTC TAY AAC-3'

**ITS1-5,8S rDNS-ITS2** (McCullough és tsi, 1998):

ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

A két szekvenciát két különböző beállításokat tartalmazó PCR programmal amplifikáltuk. Az aktinhoz az 1-es, az ITS-hez pedig a 2-es programot használtuk. A PCR reakció lépéseit a 6. táblázatban foglaltuk össze.

**6. táblázat** A kísérletek során használt PCR programok

Lépések	Program	
	1. (Liu és tsi, 1999)	2.
1. inicializáció (denaturálás)	95°C 2 perc (5 perc)	94 °C 2 perc
ciklusok (2.-5.)	30	30
2. hődenaturálás	95°C 30 másodperc (1 perc)	95 °C 1 perc
3. primer kapcsolódás (annealing)	55°C 2 perc	60 °C 1 perc
4. lassú hőmérséklet emelkedés	+ 17°C 1°C/5 másodperc	-
5. lánchosszabítás	72°C 1 perc (2 perc)	72 °C 5 perc
6. substrate clearance	72°C 10 perc	72 °C 15 perc
7. befejezés-tárolás	15°C	4 °C

A *S. japonicus* aktin génjének részleges szekvenciáját Liu és társai 1999-es cikkében talált PCR beállításokkal amplifikáltuk, azok módosításával. Ez utóbbiakat a programidő lerövidítése miatt vezettük be (a 6. táblázatban zárójelben az eredeti időintervallumokat tüntettük fel azoknál a lépéseknél, ahol azt változtattuk). A keresett aktin szekvenciát a módosított programmal kaptuk. Jellegzetessége a lassú lépcsőzetes hőmérséklet-emelkedés a primer-kapcsolódás és a lánchosszabbítás lépései között.

A *S. japonicus* aktin génjéhez a primerek tervezésekor a *S. pombe* és *Sa. cerevisiae* nukleotid és fehérje szekvenciákat a következő adatbázisokból töltöttük le (a fehérje szekvenciákra a konzervatív régiók beazonosításához volt szükségünk):

1. *S. pombe act1* gén (SPBC32H8.12c) és Act1 protein:  
*Schizosaccharomyces pombe* GeneDB  
(<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>)
2. *Sa. cerevisiae ACT1* gén (YFL039C) és Act1p: *Saccharomyces*  
Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>)

A primerek T<sub>m</sub> értékeinek meghatározására a Promega cég weboldalán (<http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>) elérhető kalkulátort használtuk.

PCR termékünket 1%-os agaróz gélben 1xTBE pufferben 120V-on futtattuk. Arról digitális képet UVP géldokumentációs készülékkel (Bio-Rad) készítettünk. A futtatások során 1kb-os DNS markert (Fermentas) használtunk.

#### **4.3.2.2. Szekvenálás és szekvencia-analízis**

A gélelektroforézist követően a PCR termék visszaizolálását a Qiagen (QIAquick Gel Extraction) kitjével végeztük a használati utasításban megadott instrukciók szerint. A tisztított PCR terméket a németországi Geneart szolgáltató laborjába küldtük szekvenálásra (<http://www.geneart.com/>).

A kapott nukleotidszekvenciát az NCBI (National Center for Biotechnology Information) szerver BLAST (Basic Local Alignment of Search Tool) adatbázisának BLASTn és BLASTx szolgáltatásai segítségével nukleotid és fehérje adatbázisokkal vetettük össze (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Így a BLASTn-t választva nukleotid szintű összehasonlítást végezhattünk szekvenciánk és a találatként kapott potenciális homológok között. A találatként kapott szekvenciák közötti azonosság és hasonlóság értékeket a hasonló szekvenciák keresésekor használtuk. A BLASTx segítségével pedig megkaptuk a hasonlóság és az

azonosság mértékét szekvenciáink fehérje átirata és az ez alapján keresett homológ-jelölt szekvenciák között. Többszörös illesztéseket a Jellyfish 3.2 szekvenciaelemző programmal készítettünk.

A *S. japonicus* szekvenciákat megjelenésük idejétől függően két forrásból töltöttük le: először (2006) NCBI Trace Archive oldaláról (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/home/>) váltak elérhetővé az adatok, majd az annotálást követően (2007) a *Schizosaccharomyces* group adatbázisból dolgozhattunk ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/schizosaccharomyces\\_group/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/MultiHome.html)).

#### **4.3.2.3. Törzsfa készítése**

A törzsfák készítéséhez az amplifikált *S. japonicus* részleges aktin szekvencia alapján a *Schizosaccharomyces* adatbázisban (Broad Institute: [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces\\_group/GeneDetails.html?sp=S7000002306338484](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/GeneDetails.html?sp=S7000002306338484)) található fehérjét használtuk fel. Az illesztéseket azokkal a protein szekvenciákkal végeztük, amelyeket a BLASTp, vagy az NCBI Homologene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/>) adatbázisaiban találtunk. Az illesztést a ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) programmal készítettük. A Phylip formátumban kapott illesztéseket törzsfa készítésére a Phylip 3.67 filogenetikai analízis programcsomaggal dolgoztuk fel (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/phylip.html>) (Felsenstein, 1996). A törzsfa készítésénél két algoritmust a Maximum likelihood-ot és NeighbourJoin-t alkalmaztunk.

A törzsfák grafikai megjelenítését a Treeview programmal végeztük (Page, 1996, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

#### 4.3.2.4. Pulzáló erőterű gélelektroforézis

Ezt a technikát a *S. japonicus* kromoszómáinak elválasztására, kromoszómaszámának meghatározására használtuk fel. Kísérleteink során a BioRad CHEF DR III pulzáló erőterű gélelektroforézis rendszert használtuk (CHEF=Contour-clamped Homogenous Electric Field). Kontrollként a *S. pombe* L972 mintákkal dolgoztuk. A mintaelőkészítés során a *S. pombe*-ra kidolgozott paramétereket alkalmaztuk (Smith és tsi, 1987), de a későbbiekben a gyakorlati tapasztalatoknak megfelelően ezeket módosítottuk:

Stacioner fázisban lévő tenyészetet 50mM EDTA-val kétszer átmostuk, majd 1mg/ml koncentrációjú CPES pufferben oldott Zymolyase 20T (ICN) enzimmel kezeltük 37°C-on, 15 percig. Ezt követően a szuszpenzióhoz 45-50°C-os hőmérsékletű 1,5%-os Low Melt agarózt (BioRad) adtunk, ezt azonnal a mintaformákba pipettáztuk. A megdermedt agarózba ágyazott sejteinket további 2-8 órán keresztül 37°C-on CPE-ben inkubáltuk. Az inkubációs idő elteltével CPE pufferünket emésztő oldatra cseréltük, mely 0,5-1mg/ml proteináz K enzimet (Sigma) tartalmaz és egy éjszakára 50°C-on hagytuk. Másnap reggel mintáinkat egymást követően háromszor átmostuk TE pufferben. A minták tárolása felhasználásig 0,25M EDTA-ban, 4°C-on történt. (A felhasznált oldatokat Sambrook és tsi. (1989) leírása alapján készítettük.)

Futtatási paraméterek:

1%-os agarózgél, 0,5×TBE puffer, 14°C

1. blokk 1: 5,4-5,4 40h 1,2V/cm, 106°  
blokk 2: 1,8-4,5 60h 1,5V/cm 106°
2. blokk 1: 5,4-5,4 40h 1,2V/cm, 106°  
blokk 2: 1,8-4,5 48h 1,5V/cm 106°  
blokk 3: 1,8-1,8 24h 3V/cm 120°

- 3. blokk 1: 5,4-5,4 72h 1,2V/cm, 106°
- blokk 2: 4,2-4,2 36h 1,2V/cm 106°
- blokk 3: 1,8-1,8 36h 2V/cm 120°

Futtatás után a gélt 5mg/ml etidium-bromidot tartalmazó steril vízben 45 percig festettük, majd egy éjszakán keresztül 0,5xTBE-ben áztattuk. UV megvilágítás mellett digitális képet készítettünk.

#### **4.3.2.5. Southern hibridizálás és detektálás**

A CHEF DRIII rendszerben futtatott és elválasztott kromoszómákhoz *S. japonicus* genomjából izolált gén darabokat hibridizáltunk.

A futtatási idő végéhez érve digitális fotót készítettünk gélnkről, majd 20 percre 0,25M HCl-dal mostuk. Kétszer 15 percre denaturáló, majd neutralizáló oldattal kezeltük a gélt. Ezután a gélt Whatman papírcsíkra helyeztük, melynek két túlnyúló vége a 20xSSC-vel telt kádba ér. Nylon membránnal (Hybond<sup>TM</sup>-N+) és további 20xSSC-vel nedvesített papírral fedtük le a gélt. E fölé 8-10 cm magas papírvatta réteget tettünk majd lesúlyoztuk. Minimum 8-10 óra várakozás után a kapilláris transzfer eredményeként a membránhoz tapadó DNS-t UV besugárzással (150mJ) immobilizáltuk, desztillált vízzel tisztítottuk és száradni hagytuk. A hibridizálás első lépéseként a membránunkat előhibridizációs oldatban minimum 30 percig inkubáltuk. A hibridizálást, hasonlóan az előhibridizáláshoz 68°C-on végeztük egy éjszakán keresztül. (A felhasznált oldatokat Sambrook és tsi. (1989) leírása alapján készítettük.) A PCR termékünket tisztítottuk és megjelöltük a random primer DIG jelölő kitet használva. A már korábban meghatározott koncentráció alapján számoljuk ki a felhasználandó jelölt próba mennyiségét. A jelölést és a detektálást a Roche

Diagnostics cég labelling DIG jelölő és detektáló kittel végeztük, a gyártó leírását követve (DIG High Prime Labeling and Detection Kit II).

Fóliába zárva röntgen film segítségével detektáltuk a kibocsátott jelet.

#### **4.3.2.6. Fehérje extrakció**

Az extrakció során, szilárd táptalajon növekedő, egysejtes és micéliális fázisban lévő *S. pombe* tenyésztettel dolgoztunk (LNBA). A tenyészet 18 napos volt. Az extrakció kezdeti lépései az agarkockában növekvő micélium kivonására, megtisztítására irányultak. Ezt a sejtes fázisban lévő minta esetében is elvégeztük, így mindkét mintánk feldolgozása azonos volt.

Az agarkockákat és az agarkockákkal együtt kivágott hifasejteket ezért steril eppendorf csövekben 95°C-on 4 percig rázatott szárazblokkban inkubáltuk. Majd centrifugáltunk és késlekedés nélkül leszívtuk a felülúszót. A csövek aljára kiüledett micéliumot LNB tápoldatban vettük fel. A tenyészeinket a tápfolyadék eltávolítása után 1-1ml 20%-os triklór ecetsavban (TCA, Sigma) szuszpendáltuk fel. Az újabb TCA hozzáadása után üvegyöngyök segítségével törtük fel a sejteket. Centrifugálás és szűrés segítségével eltávolítottuk az üvegyöngyöket és a felülúszót. A pelletet 1x minta pufferben vettük fel. Felhasználás előtt 5 percig 100°C-on forraltuk.

#### **4.3.2.7. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis**

A megfelelő összetételű gélek elkészítése után (7. táblázat) a mintát 50 majd 200V-on 1-1,5 órán át futtattuk. Futtató és minta puffereinket Sambrook és tsi (1989) leírása alapján készítettük el.

**7. táblázat** Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis során használt gélek összetétele



Futtató vagy szeparáló gél		Koncentráló gél	
12%	30ml	5%	100ml
30% akrilamid mix	12ml	30% akrilamid mix	17ml
3M Tris-HCl pH8.8	3,8ml	1M Tris-HCl pH6.8	12,5ml
10% SDS	300µl	10% SDS	1ml
H <sub>2</sub> O	14ml	H <sub>2</sub> O	69,5ml
10% ASP	300µl	10% ammónium perszulfát	5µl/ml
TEMED	12µl	TEMED	1µl/ml

A futtatáshoz méretmarkertént a Rainbow Molecular Weight Marker (GE) terméket használtuk.

A gél 10%-os ecetsav és 30%-os metanolban oldott Comassie Brilliant Blue festékkel egy éjszakán keresztül festettük. Majd 10%-os ecetsav és 30%-os metanol elegyében áztattuk.

#### **4.3.2.8. Fehérjeminta előkészítése tömegspektrometriai analízisre**

A festett gél kisebb méretű, megközelítőleg azonos darabokra vágjuk, figyelve arra, hogy az egymás melletti zsebben futtatott sejtes és micéliális tenyészetből izolált fehérjepreparátum párhuzamosan futott, azonos méretű darabjait vágjuk ki. A továbbiakban pedig követtük a Promega cég Trypsin Gold termékéhez mellékelt leírását a gélben történő fehérjeemésztésre vonatkozóan. A kiszáritott peptideket -20-80°C-on tároltuk. A tömegspektrometriai méréseket a Sussex Egyetem Proteomika Intézetében végezték el LC-MS/MS módszerrel.

#### **4.3.2.9. A fehérjeminta elemzése**

A LC-MS/MS-t követően az adatokat a BioWorks 3.3.1 szoftver segítségével dolgoztuk fel, amely a SEQUEST proteinkereső algoritmust alkalmazta. A

találatokat több szempontból elemezte a szoftver. Ezek az értékek a P (probability score), Sf (final score), XCorr (cross-correlation), DeltaCn (delta correlation), Sp (preliminary score) és Ions. Egy filter szett alkalmazásával szűrtük ki a hibás találatokat. Ebben az esetben a szűrés során az XCorr (XC) és a DeltaCn értékekre fektettük a hangsúlyt. Az XC érték, a kereszt korrelációs érték, amely a lehetséges peptidek végső besorolása. Akkor megfelelő, ha értéke legalább 2,0 vagy annál magasabb (egyszeresen, kétszeresen és háromszorosan töltött peptidek Xcorr értéke >1,9, 2,2 és 3,75). A DeltaCn legalább 0,1, vagy ennél magasabb érték esetében jelez helyes találatot. Ez az érték azt mutatja, hogy egy fehérje esetében mennyire különbözik az első lehetséges találat a másodiktól. Mivel a célunk az élesztő-micélium átalakulást követően nagy mennyiségben expresszáladott fehérjék kimutatása volt, ezeket a szűrőket magasabbra állítottuk és a találatok esetében a minimum XC érték 20,14 és a DeltaCN 1,9 volt. Ez adhat magyarázatot a kis számban azonosított fehérjékre.

A fehérjékre vonatkozó adatokat a következő adatbázisból töltötték le: <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/yeast/pombe/>.

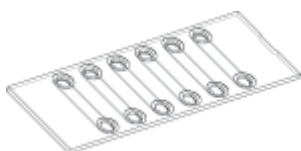
### **4.3.3. Mikroszkópia**

A mikroszkópos felvételeket Olympus BH-2, Zeiss LiveCell fénymikroszkópokkal és a Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal készítettük.

A Zeiss LiveCell mikroszkóppal készített felvételeket a AxioVision Veiwer szoftver (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) segítségével vizsgáltuk. A konfokális mikroszkóppal készített felvételek megtekintéséhez az AimImageBrowser szoftver (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) telepítésére volt szükség. A vad típusú és morfológiai mutáns törzseinkről készített térhatású képeket Nomarski objektív segítségével fényképeztük.

#### 4.3.3.1. Speciális tárgylemez

Kísérleteink során a *S. pombe* hifák fejlődésének nyomonkövetésére és könnyebb megfigyelésére speciális tárgylemezt (Integrated BioDiagnostics,  $\mu$ -slide VI) alkalmaztunk (3. ábra).



**3. ábra** A micéliális növekedés során felhasznált  $\mu$ -slide VI tárgylemez rajza  
Méretek: 6 csatorna,  
nyílás átmérője: 4 mm  
csatorna térfogata: 30  $\mu$ l  
csatorna hossza: 17 mm  
csatorna szélessége: 3,8 mm  
csatorna magassága: 0,4 mm

Ez az eszköz nagyon hasznosnak bizonyult a hifák fényképezése során, ugyanis az agarba ágyazódott, fűrődött hifa fonalak fotózását sokszor nehezítette a vastag táptalaj fénytörése. A tárgylemez segítségével végigkövethettük az egyes hifa fonalak struktúráját, növekedését időben, ill. a fejlődési állapotokat is sikerült megörökíteni.

A kísérletek kezdetén a tárgylemez hosszanti folyosóját töltöttük fel a még meg nem szilárdult, agart tartalmazó tápoldattal (30 $\mu$ l). A táptalaj megdermedése után vagy leoltottuk az egyik lyukba a tenyészetet, vagy oda újabb táptalajt csepegtettünk, olyan vastagságban hogy sejtjeink könnyen elérhessék a csatornát és ezután kacsnyi tenyészetet helyeztünk a megszilárdult táptalajra. A szemben lévő lyukat kísérleteinknek megfelelően töltöttük fel táptalajjal, vagy annak cAMP-vel (8-bromoadenozin 3',5'-cAMP ciklikus monofoszfát, B5386 Sigma) kiegészített keverékével, vagy cAMP oldattal átitatott filter papírral (cAMP törzsoldat: 0,1M-os, az alkalmazott koncentráció: 50mM). Mivel tenyészeinket akár több hétig is vizsgáltuk,

benedvesített bársony darabbal biztosítottuk a kellő nedvességet a táptalaj számára. A tárgylemezt a bársonydarabra helyezve zárt petri csészében 30°C-on inkubáltuk.

#### **4.3.3.2 Fluoreszcens festések**

Citológiai vizsgálatoknál gyakran alkalmaznak fluoreszcens festési eljárásokat. Ezeknek az a lényege, hogy ha egy fluoreszcens festékkel megjelölt anyag specifikusan képes hozzákötődni a sejt bizonyos alkotóelemeihez, akkor ezek az alkotóelemek különböző megvilágítás hatására oly módon fluoreszkálnak, hogy jól láthatóak és jól elkülönülnek a környezetüktől. A megfestett részek lehetnek pl. a sejtmag, sejtfal, vakuólumok, az aktin, de más fehérjék vagy fehérjecsaládok is.

##### **4.3.3.2.1. Vakuólum festési eljárások**

Az itt felsorolt festékeket a *S. pombe* és *S. japonicus* sejteiben és hifáiban található vakuólumok láthatóvá tételére és az endocitózis folyamatának követésére alkalmaztuk.

#### **FM4-64**

Az endocitózis markerként is ismert amfifil festék a vakuólum membránt teszi láthatóvá (Vida és Emr, 1995). Szerkezetileg három részre tagolódik: hidrofób farok (1), amely elősegíti a molekula beépülését a membránba, fej (2), amely megakadályozza a molekula átjutását a membránon és a test (3), amely meghatározza a festék által kibocsájtott fény jellegét. Az FM4-64 egyaránt jól alkalmazható növényi, állati és gomba sejtekben (Betz és tsi, 1996, Bolte és tsi, 2004, Vida és Emr, 1995, Fisher-Parton és tsi, 2000). Élesztősejtek festéséhez exponenciális fázisban lévő tenyészetet YEL-ben mostuk, majd (16mM törzsoldatból; Molecular Probes, T3166) FM4-64-et

adtunk a tenyészethez 20  $\mu\text{M}$ -os végkoncentrációban. 30°C-on, 10 percig inkubáltunk. Újabb mosás és 30 perces inkubálás után rodamin filtert felhasználva figyeltük a sejteket a mikroszkópban. Az inkubálási idő 4-8 órára növelésével értük el az agarba ágyazott micéliumok FM4-64 festését. Ugyanezt a festéket használtuk a *S. japonicus* endocitózisának térbeli és időbeli nyomon követésére is élő sejtekben.

### **MDY-64**

A Molecular Probes cég egy másik fluoreszcens festékét (yeast vacuole membrane marker MDY-64, E komponens, Y7531) is használtuk a *S. japonicus* sejtek vakuólumainak láthatóvá tételére. A vakuólum festő kit E komponensének működése a már említett FM4-64-hoz hasonló. A sejteket 10mM-os 5% glükózt tartalmazó HEPES pufferben szuszpendáltuk fel, majd hozzáadtuk a festéket (10mM törzsoldat). 10 $\mu\text{M}$ -os végkoncentrációjú festékekkel dolgoztunk. Rövid inkubálás után a sejteket friss HEPES oldatban vettük fel és mintát készítettünk. A két azonos funkciójú festéket (FM4-64 és MDY-64) különböző kutatóhelyeken, az adott labor preferenciái miatt használtuk.

### **CDCFDA** (Roberts és tsi, 1991)

CDCFDA (5-(és-6)-karboxi-2',7'-diklorofluorescein diacetát) az alacsony pH-val rendelkező sejtalkotók (pl.: vakuólumok) specifikus festéke, mely a diffúz módon a lumenbe kerülve fluoreszcens terméké hidrolizál (Roberts és tsi, 1991).

*S. pombe* és *S. japonicus* sejtek exponenciális fázisban lévő tenyészeit YEL + 10mM citromsav oldatban mostuk, majd YEL/citromsav +25 $\mu\text{M}$  CDCFDA-ban (10mM törzsoldat; Molecular Probes, C369) szuszpendáltuk fel. Ezt követően 15 percig szobahőn inkubáltuk. A sejteket háromszor

mostuk a már említett YEL/citromsav oldatban. A mikroszkópos megfigyelés során FITC filtert alkalmazva válik láthatóvá a fluoreszcens jel.

Micélium festés esetében az agarózkockákat 30-90 percig inkubáltuk azonos koncentrációjú CFCFDA-ban majd a festéket YEL-lel lecserélve távolítottuk el.

#### **4.3.3.2.2. Sejtfal és szeptum festés (Johnson és tsi, 1979)**

A kalkofluor, egy olyan szerves vegyület, amely UV fényvel történő gerjesztés esetén fluoreszkál (optimális hullámhossz 360-400 nm). Segítségével például *S. pombe* sejtfalon nyomonkövethető a szeptum képzés, vagy a szeptáció mutációja (pl.: Johnson és tsi, 1979, Streiblova, 1984). A *S. japonicus* esetében is sikerrel alkalmazták a sejt polaritás változás követésére (Sipiczki és tsi, 1998b). Morfológiai mutánsaink szeptum képzésének jellemzésére használtuk. A sejteket a protokolnak megfelelően kalkofluorral (Fluorescent Brightener, Sigma) festettük, majd mintáinkat a tárgylemezre cseppentettük, fedőlemezzel lefedtük és UV filtert használva elemeztük a mikroszkóp alatt.

#### **4.3.3.2.3. Sejtmag festés (Alfa és tsi, 1993)**

A DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a DNS kettős spirál kis árkainak AT gazdag régióiba kötődő DNS festék. *S. pombe* és *S. japonicus var versatilis* esetében sikeresen alkalmazták a kromoszómaszámok meghatározására és a *S. japonicus var japonicus* sejtmagszámának meghatározására élesztő és hifasejtekben (Alfa és tsi, 1993, Sipiczki és tsi 1998a). Ezt a festést a *S. japonicus var. japonicus* kromoszómaszámának meghatározására használtuk. Mintáinkat fedőlemezzel lefedtük és UV-filtert használva elemeztük a mikroszkóp alatt.

#### **4.3.3.2.4. Aktin festés (Marks és Hyams, 1985)**

A fallotoxinok alkalmasak az F-aktin jelölésére és azonosítására fixált és permeabilizált sejtekben. Ezért az aktinfestéshez rodamin jelölt Phalloidin-t (Molecular Probes, R415) használtunk a következő protokoll szerint: PM oldatban oldott paraformaldehiddel 60 percen keresztül szobahőmérsékleten fixáltuk sejtjeinket, ezután háromszor mostuk PM pufferben. A sejtmembrán permeabilitásának növelése érdekében a sejtekre PM-ben oldott 1%-os TritonX-100-at tettünk, ezt 45 másodpercig hagytuk rajta. Majd újabb három mosás következett PM pufferben. 20 µl kezelt tenyészethez 1µl (0,2 unit) festéket adtunk, ezután 60 perc inkubálás következett. A mikroszópós megfigyeléshez és a képek készítéséhez rodamin filtert használtunk.

#### **4.3.3.2.5 pREP41GFP plazmid felhasználása a hifasejtek megfigyelésére**

A pREP41 a pREP plazmidcsalád tagja, expressziós plazmid. A pREP plazmidok úgynevezett *nmt* promótere a *S. pombe* tiamin szintézisében részt vevő *nmt1* gén promotere, amely tiamin jelenlétében maximális repressziót, azonban tiamin hiányában magas expressziót mutat. A gén promotert és terminátorát tartalmazó DNS fragmenteket megfelelő plazmidba klónozták, előállítva a replikatív pREP (pREP3 LEU2 markerrel, pREP4 *ura4* markerrel) és az integratív pRIP vektorokat (Maundrell, 1993). A promoter irányított mutagenézisével közepes (pREP41/42) és alacsony (pREP81/82) expressziót biztosító vektort is előállítottak, többféle markerrel (Basi és tsi, 1993). A doktori munkához biztosított eredetileg *leu1* auxotrófiát hordozó *S. pombe* törzset, GFP fehérjét kifejező pREP41-GFP plazmiddal transzformálták (Craven és tsi, 1998). A *S. pombe* sejtjeiben felhalmozódó zöld fluoreszcens fehérje segítségével a hifasejteket, a sejtalkotók számát és helyzetét tudtuk alaposabban megfigyelni. A mikroszkópos megfigyelés során FITC filtert alkalmazva válik láthatóvá a fluoreszcens jel.

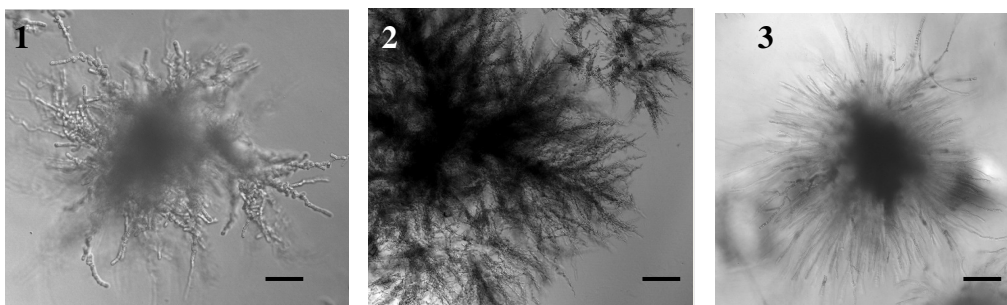
## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Micélium-képzés és citológia

#### 5.1.1. A két faj micélium-képzési stratégiája eltérő

A *S. japonicus* dimorf hasadó élesztőgomba, képes valódi micélium képzésére (pl. van der Valt és Yarrow, 1984, Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b, Bozsik és tsi, 2002). A *S. pombe* vad típusa, jól meghatározott körülmények között szintén képes valódi micélium létrehozására (Amoah-Buahin és tsi, 2005, Dodsgon és tsi, 2009). Ebben a fejezetben a két azonos nemzetségbe tartozó faj e tulajdonságának összehasonlítását mutatjuk be.

A két faj vad típusú törzseinek micélium-képzését limitált nitrogénforrást tartalmazó és a *S. pombe* micélium-képzését indukáló táptalajon (LNBA), azonos tenyésztési körülmények között hasonlítottuk össze (4. ábra). A telepeket a táptalaj egy-egy szeletének kivágása után fényképeztük.

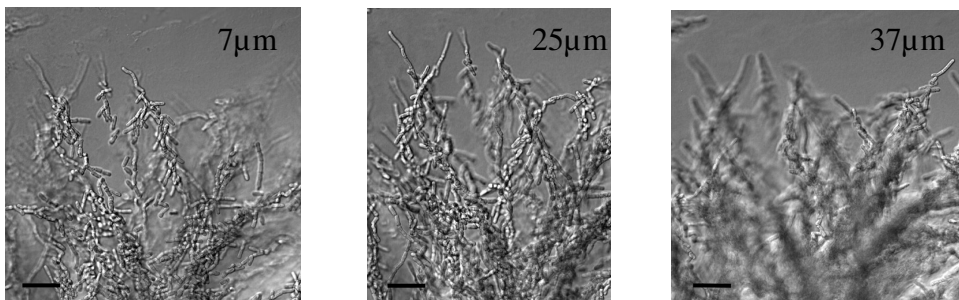


**4. ábra** Micéliumot képző telepek. (1) *S. pombe* NCYC132 törzs, 14 nap, 30°C, LNBA táptalaj. Méretvonal: 30  $\mu$ m. (2) *S. pombe* L975 törzs, 21 nap, 30°C, LNBA táptalaj. Méretvonal: 100  $\mu$ m. (3) *S. japonicus* 7-1 törzs, 8 nap, 30°C, LNBA táptalaj. Méretvonal: 100  $\mu$ m.

Szabad szemmel vizsgálva a telepek alatt képzett micéliumokat, megfigyelhetjük, hogy az invazív növekedés mindhárom esetben a telepek alatt, a fonalak által a táptalajba vágjt, ék (búzaszem) alakú réseken keresztül indult meg. Mindegyik esetben egyöntetűen az éktől sugárirányban kifelé.



A *S. pombe* NCYC132 és L975 törzsei közül a micélium-képzés vizsgálatát a laboratóriumi kísérletekhez gyakrabban használt L975-ös törzssel folytattuk. Az L975 törzs hifái a növekedés korai szakaszában széttartóak azonban viselkedésük a későbbiekben, az elágazások megjelenésével megváltozik: egymással nagyobb, vastagabb egységekbe csavarodva hatolnak be a táptalajba (5. ábra). A korai fázis széttartóan növekvő fonalai a később kialakuló vastagabb egységek vezető szálai lesznek, melyek növekedésükkel biztosítják az egész egység további fejlődését. Az elágazások azok, amelyek a kötélszerűen összefonódott fonalaktól eltérő irányba növekednek, ezáltal kialakítva az egységek hálózatát. A kötegek vezető szálainak csúcssejtjei meghosszabbodnak, ami azonos a *S. japonicus* hifáinál látottakkal. A köteg belsejében lévő hifák jellegzetesen rövidebbek és rövid sejtekből állnak.



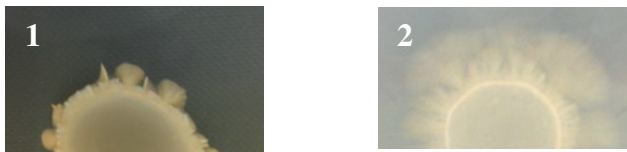
**5. ábra** Az agarkockákban több micélium réteget különítettünk el. A szeletek távolsága: 7, 25, 37  $\mu\text{m}$ . Méretvonal: 25  $\mu\text{m}$

Mikroszkóp alatt vizsgálva a micéliumot jól látható, hogy a *S. japonicus* hifái széttartóan növekednek; megjelennek a már ismert gyors növekedésű hifák (melyek a növekedési front előtt járnak) és a micélium tömegét adó többkevesebb elágazást tartalmazó fonalak (Sipiczki és tsi, 1998a és saját megfigyelés alapján). A táptalaj felszínétől mélyebbre hatolva mindkét faj vizsgált törzseinek esetében sűrűbb micéliumot találunk.

Már a kísérletek kezdetén feltűnt, hogy a két faj a hifa növekedés gyorsaságában is különbözik. Míg a *S. japonicus* 7-1 törzsének 5-10 napos tenyészeit már jól látható micélium veszi körül, addig a *S. pombe* L975 törzsének jellegzetes, köteges szerkezetű micéliumának megjelenéséig legalább 14 napot kell várni.

Szabad szemmel megfigyelhető, hogy mind a két faj azonos nagyságú élesztőtelepet hoz létre. A telepek körül képzett micélium hossza és a telepeket alkotó sejtek, így a hifák mérete is eltér. LNBA táptalajon 14 nap elteltével a *S. pombe* L975-ös törzse 1-3 mm-es micéliumot növeszt, míg a *S. japonicus* 7-1 micéliuma akár 10-17 mm hosszú is lehet. A *S. pombe* élesztősejtjeinek átmérője 3,5 mikron és hossza a sejtciklus alatt változó 8-14 mikron (van der Valt és Yarrow, 1984). Míg a *S. japonicus* élesztősejtek átlagos mérete 5-9 x 6-14 mikron (van der Valt és Yarrow, 1984).

A *S. japonicus* esetében az irodalmi adatok szerint a nitrogén grádiens az, amely a micélium növekedést kiváltja és irányítja (Sipiczki és tsi, 1998a), ezért megvizsgáltuk a micélium méretét LNBA táptalajon. 5 nap inkubálás után a 6. ábrán látható tenyészetek körül YEA táptalajon 2-4 mm, LNBA táptalajon 3-8 mm hosszú micélium fejlődött. 21 nap elteltével is megmértük a micéliumokat és azt tapasztaltuk, hogy a két telep körül kialakult micélium mérete néhány milliméteres eltéréssel hasonló hosszúságú (18-23 mm). Tehát a *S. japonicus* 7-1 dimorf átalakulása gyorsabban végbemegy csökkentett mennyiségű nitrogént tartalmazó táptalajon, de kialakult micélium hossza hasonló a két táptalajon.



**6. ábra** A *S. japonicus* 7-1 törzs micélium-képzése YEA (1) és LNBA (2) táptalajokon

### 5.1.2. *S. japonicus* hifái a speciális tárgylemezben

Kísérleteinkhez a továbbiakban az Integrated BioDiagnostics,  $\mu$ -slide termékcsaládjából választottunk egy speciális tárgylemezt (lásd: Anyagok és módszerek fejezet 4.3.3.1. bekezdés), amelynek egyik előnye, hogy sejtjeinket és a kialakult micéliumot könnyebben láthatóvá tudtuk tenni, mint az agarból kivágott szeletek esetében. A másik előnye az volt, hogy meghatározott időnként követni tudtuk a tenyészet változásait. A tárgylemez kialakítása lehetővé tette, hogy növekedést befolyásoló, vagy a sejtalkotókat láthatóvá tévő vegyszereket is a tenyészethez adjunk a két végén lévő nyíláson keresztül. A *S. japonicus* tenyésztési körülményeit ebben a tárgylemezben gyorsan optimalizálni tudtuk: az 7-féle kipróbált táptalajból négyen tapasztaltunk növekedést (8. táblázat). A 1,5 % agart tartalmazó táptalajon nem alakult ki a micélium. A későbbiek során a legrövidebb idő alatt leghosszabb hifát biztosító 5. számú táptalajt használtuk. A 6.-7. próba összeállításakor a cAMP élesztő-micélium átalakulásra gyakorolt hatására voltunk kíváncsiak. Az így kapott eredményeink a korábbi vizsgálatokat erősítik meg, melyek szerint a magas cAMP koncentráció gátolja a hifák kialakulását és a sejtes forma fenntartását segíti elő (Sipiczki és tsi, 1998b).

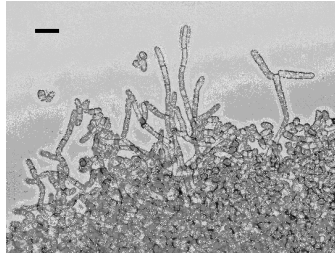
### 8. táblázat A *S. japonicus* 7-1 törzs esetében kipróbált táptalajok

(Jelmagyarázat: **n**: nem láttunk fonalas növekedést, **i**: valódi hifát láttunk)

próbák	összetétel			agar koncentráció	fonalas alak
	első lyuk	csatornában	hátsó lyuk		
1.	YEA	YEA	YEA	1,5 %	n
2.	YEA	YEA	YEA	2,0 %	i
3.	SMA	YEA	YEA	2,0 %	i
4.	SMA	LNBA	YEA	2,0 %	i
5.	LNBA	LNBA	YEA	2,0 %	i
6.	LNBA	LNBA	LNBA+cAMP	2,0 %	n
7.	LNBA	LNBA	YEA+cAMP	2,0 %	n

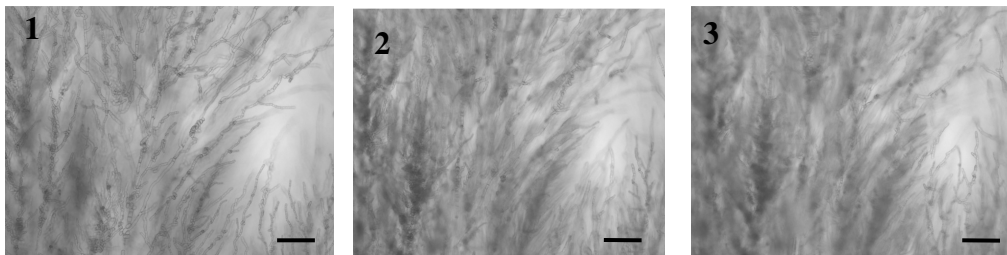
A növekedési fronttal szemben (hátsó lyuk) nitrogénben gazdag, komplett szilárd táptalajt csepegtettünk, ezáltal indukálva a dimorf átalakulást, biztosítva a hifa növekedést irányító nitrogén gradienst.

A leoltott exponenciális fázisban lévő tenyészetekből 3 nap elteltével, a tárgylemez csatornájában megjelentek a meghosszabbodott sejtek és hifafonalak (7. ábra).



**7. ábra** A *S. japonicus* 7-1 hifa növekedésének kezdeti stádiuma a speciális tárgylemezben. Méretvonal: 10  $\mu\text{m}$

A speciális tárgylemez hosszanti folyosójának térfogata 30  $\mu\text{l}$ . Ebben a rendelkezésre álló növekedési térben a tenyészet hifáit jól elkülöníthetően lehetett megfigyelni. A hifa fonalak átmérője 6-10  $\mu\text{m}$ , ezért több réteg hifa is kialakulhatott tárgylemezünk csatornájában (8. ábra).



**8. ábra** A *S. japonicus* 7-1 hifáinak réteges elhelyezkedése a speciális tárgylemez csatornájában lévő táptalajban. A rétegeket 10 mikrononként fotóztuk 30 db képet készítettünk, ebből 3 db-ot emeltünk ki: 8, 14 és 17. képeket, amelyek egy-egy rétegnek felelnek meg. Méretvonal: 100  $\mu\text{m}$

### 5.1.3. *S. pombe* hifái a speciális tárgylemezben

A *S. pombe* fonalas növekedésének kiváltása érdekében, a *S. japonicus*-hoz hasonlóan, több táptalaj-kombinációt vizsgáltunk (a *S. pombe* két vad típusú törzse közül a laboratóriumokban gyakrabban használt, L975-ös törzsét használtuk a további kísérleteinkhez). Az egyes kombinációkban az agar koncentrációját, a táptalajokat és azok helyét is változtattuk (9. táblázat). A 9. táblázat 1-5. próbája esetén a Petri csészékben produkált invazív hifa növekedését (4. ábra) nem tudtuk tárgylemezünk segítségével megismételni. 2-4 hét elteltével a csatornákat és a beadagolás helyéül szolgáló lyukakat kitöltő komplett (YEA), vagy a limitált nitrogénforrást tartalmazó LNBA táptalajban nem jelentek meg a hifák. Az első négy komplett táptalajt alkalmazó próba esetében megfigyelésünk Amoah-Buahin és társai tapasztalatát támasztotta alá, amely szerint a vizsgált *S. pombe* L975 vad típusú törzsnek túl magas a rendszerbe bejuttatott nitrogén mennyiség a fonalas alak kialakulásához. Érdekes, hogy a csak LNBA-val feltöltött 5. próba esetében az LNBA-t tartalmazó Petri csészékben tapasztalt invazív növekedést nem tudtuk kiváltani.

A hifák növekedésének elősegítése érdekében cAMP-vel (50 mM) kiegészített táptalajt csepegtettünk, vagy cAMP oldattal átitatott, steril filterpapírt raktunk a növekedési fronttal szemben lévő lyukba (9. táblázat 6-10. próba) (Amoah és tsi, 2005 alapján). Majd mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a tenyészet fejlődését. Ezeknél a kombinációknál figyeltük meg a fonalas alakok kialakulását. A későbbiekben 6-8. számú táptalajt használtuk a hifanövekedés vizsgálatához.

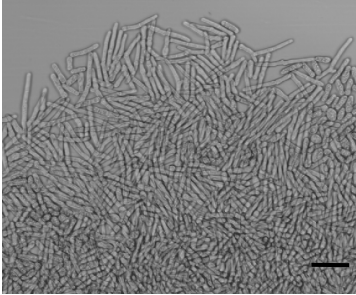
A kontrollként használt *S. japonicus* 7-1 törzs esetében, az ugyanolyan körülmények között és mennyiségben adagolt cAMP gátolta a hifák kialakulását. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a *Sa. cerevisiae* esetében a tenyészethez adott cAMP a pszeudohifák kialakulásához vezetett. Az

álhifákat alkotó sejtek ugyanakkor alakjukban különböztek a nitrogén éhezés hatására kialakult fonalakat alkotóktól. Míg az utóbbiakat meghosszabbodott, addig a cAMP-vel kezelt tenyészetek álfonalait kerek sejtek alkották (Pan és Heitman, 1999). A *S. pombe* sejtjei hengeres alakúak (van der Valt és Yarrow, 1984). Megfigyeléseink szerint minden vizsgált mintában a cAMP, a 7-15 napos inkubálást követően, a *S. pombe* hengeres sejtjeinek további megnyúlását és több sejtből álló rövid fonalak kialakulását idézte elő. A rövid fonalakat pszeudohifaként kezeltük. A *S. pombe* pszeudohifái a mi meghatározásunk szerint a táptalaj felszínén növekvő 3-5 sejtes fonalak, amelyek 1-2 elágazást tartalmazhatnak. Az különbözteti meg őket a valódi hifáktól, hogy nem invazívak, azaz nem hatolnak be a táptalajba. Ezeket a csatornában leoltott tenyészetek növekedésének 10-15. napján, a tenyészetek perifériáin figyelhettük meg. További inkubálás után a tenyészetekben megfigyeltük a valódi hifák kialakulását is.

**9. táblázat** A *S. pombe* L975 és 1165 törzskönyvi számú törzsek esetében kipróbált táptalajok (<sup>1</sup> n: nincs fonalas növekedést, i: megnyúlt sejteket, több sejtből álló pszeudo- és valódi hifát láttunk)

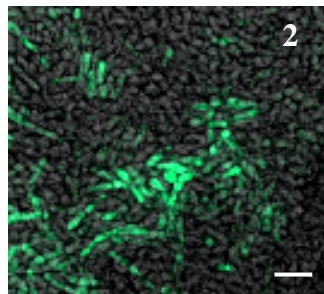
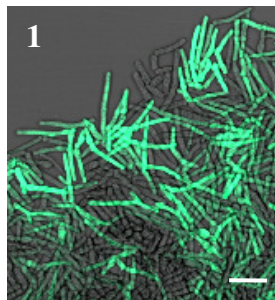
próbák	összetétel			agar koncentráció	fonalas alak n/i <sup>1</sup>
	első lyuk	csatorna	hátsó lyuk		
1.	üres	YEA	YEA	1,5 %	n
2.	YEA	YEA	YEA	1,5 %	n
3.	YEA	YEA	YEA	2,0 %	n
4.	LNBA	LNBA	YEA	2,0 %	n
5.	LNBA	LNBA	LNBA	2,0 %	n
cAMP-vel kiegészített táptalajok					
6.	LNBA	LNBA	LNBA+cAMP	2,0 %	i
7.	LNBA	LNBA	YEA+cAMP	2,0 %	i
8	LNBA	LNBA	cAMP oldatba áztatott filter	2,0 %	i
9.	SMA	LNBA	LNBA+cAMP	2,0 %	i
10	üres	LNBA	LNBA+cAMP	2,0 %	i

Mikroszkópunk lencséje alatt a 7-10 napos tenyészet periferiáján megnyúlt sejteket, többsejtes egyetlen elágazást tartalmazó képleteket láttunk. Ezzel szemben a tenyészet belső részein az egysejtes forma dominált (9. ábra).



**9. ábra** A *S. pombe* L975 törzsének tenyészet a 7. számú táptalajon. Méretvonal: 10  $\mu$ m

Kísérleteinket a vad típusú törzs mellett egy olyan speciális törzssel is elvégeztük, amely a pREP41-GFP vektorral történő transzformálást követően a citoplazmában felhalmozódó GFP (green fluorescence protein) fehérjét termelt (10. ábra). A 1165-ös törzset a 9. táblázatban bemutatott 7. és 8. számú táptalajokon tenyésztettük. Megfigyelésink szerint a fluoreszcens jel nem jelent meg minden sejtben (ennek magyarázata az lehet, hogy a transzformálás után nem minden sejt hordozta a plazmidot, valamint bár replikatív a plazmid, az osztódás során nem került be a leánysejtekbe). Ez esetünkben hátrány és előny egyszerre, mert több alkalommal az érdekes sejteket nem tudtuk megvizsgálni, ugyanakkor a nagy sejtsűrűségű tenyészetben könnyebb volt felfedezni a „zöld színű” többsejtes fonalakat.

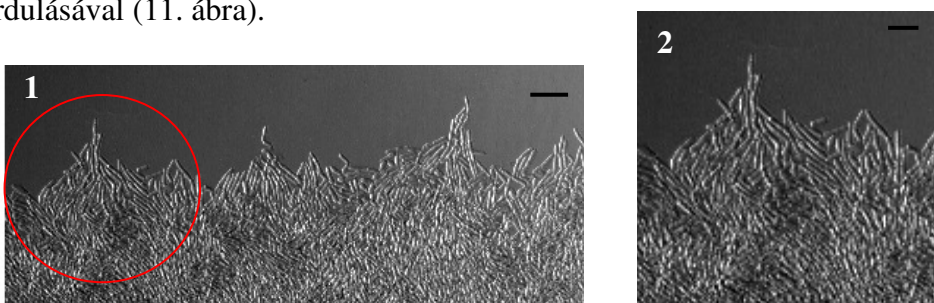


**10. ábra** A GFP-t expresszáló 1165-ös törzs tenyészetének fluoreszkálása. (1) a tenyészet külső kerületén a néhány osztódás után együtt maradó,

meghosszabbodott leánysejteket láthatjuk (2) az inokulum belsejében élesztősejteket találhatunk. Méretvonalak: (1) 10  $\mu\text{m}$ , (2) 5  $\mu\text{m}$

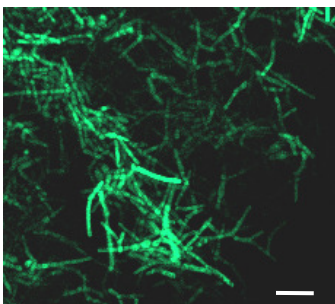
### 5.1.3.1. Köteges („rope”) szerkezet kialakulásának kezdeti lépései és micélium-képzés a csatornában

A csatornában megfigyeltük, hogy a megnyúlt sejtek vagy az osztódás után együtt maradók, leánysejtek a cAMP-t tartalmazó területek felé orientálódnak. Ezzel elkezdődik a köteges struktúra kialakulása a sejtek egymás irányába fordulásával (11. ábra).



**11. ábra** A *S. pombe* L975 törzsének sejtjei a tárgylemez folyosójában (a 7. számú táptalajon). A bekarikázott részlet nagyítva a második képen található. Méretvonalak: 20  $\mu\text{m}$  (1), 10  $\mu\text{m}$  (2)

A 12. ábrán jól látható, hogy a később kialakuló pseudohifák elágazásai a területek hatékony kolonizációja mellett a struktúra összetartására is irányulnak, sok esetben nem kifelé, hanem a struktúra belseje felé növekednek. Ezt a Petri csészében növekvő tenyészetek esetében is megfigyelhettük.

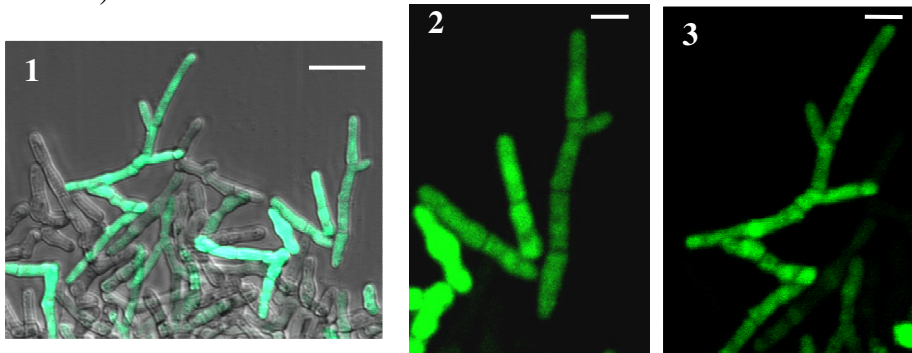


**12. ábra** A GFP proteint tartalmazó pseudohifa sejtek jól elkülöníthetőek a *S. pombe* 1165-ös törzsének tenyészetében. Méretvonal: 10  $\mu\text{m}$



A citoplazmában felszaporodó GFP protein segítségével a meghosszabbodott sejtek és az elágazásokat tartalmazó néhány sejtes, rövid pszeudohifák szeptumainak helyzetét is megvizsgálhattuk.

Egy idősebb tenyészet perifériális régióját vizsgálva a következő képet látjuk (13. ábra):



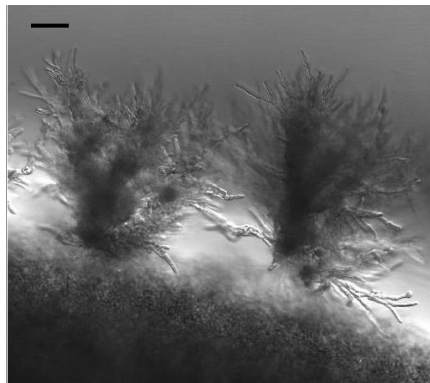
**13. ábra** Többsejtes, rövid pszeudohifák a *S. pombe* 1165 törzsének 15 napos tenyészetében. További magyarázat a szövegben. Méretvonalak: (1) 10 µm, (2, 3) 5 µm

A 13/1. ábrán a két kiemelt többsejtes elem eltávolodott a „rope” szerkezet többi tagjától, ez valószínűleg a tárgylemez mozgatásának következménye lehet, de így a többi fluoreszcens sejtől elkülönítve vizsgálható. Az 13/2. ábrán látható rövid pszeudohifa négy sejtből áll, melyek mindegyike festődött GFP-vel. Szintén jól láthatóak a nem festődött szeptumok, valamint a citoplazma bizonyos sötéten maradt részein a sejtmag és a vakuólumok körvonala figyelhető meg. Egy elágazás indul a szeptum alól.

A 13/3. ábrán egy 5 tagú, a fejlődés egy későbbi fázisában lévő pszeudohifát láthatunk. A csúcssejtje hosszabb, mint az azt követő sejtek hossza. Két elágazást tartalmaz. A csúcssejttől számított harmadik sejtje kisméretű, ez a *S. japonicus* valódi hifáinál is megfigyelhető (pl. az 5.1.5. Vakuólum típusok *S. japonicus* hifasejtékben című fejezetben).

A fonalakon belül az egyes sejteket a *S. pombe* esetében is szabályosan ismétlődő szeptumok választják el. A sejtek a képeken nem olyan hosszúak, mint a *S. japonicus* hifái esetében, ezt a telepek alatti micéliumot tartalmazó agarkockák esetében is megfigyelhettük. A *S. pombe* stratégiája úgy tűnik inkább a stabil, erős, markáns szerkezetű hifakötegek kialakítása, mintsem a *S. japonicus*-nál megfigyelt jóval hosszabb egymástól széttartóan növekvő hifákéi.

Ebben a speciális tárgylemezben az agarkockákban megfigyelt valódi hifákat a leoltott sejsűrűség és az inkubációs idő növelésével értük el (14. ábra). A 12. ábrán néhány sejtréteg alakítja ki a jellegzetes elrendeződést. A 14. ábrán ugyanakkor az látható, hogy ha több sejtet oltunk le a csatorna bevezető nyílásához, kialakulhat az invazív fonalas alak.

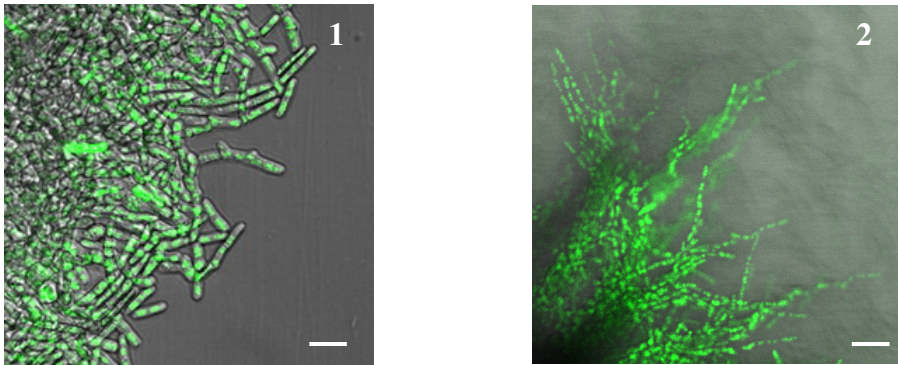


**14. ábra** A *S. pombe* L975 törzsének micélium-képzése a tárgylemez csatornájában (a 7. számú táptalajon). Méretvonal: 50  $\mu\text{m}$

#### **5.1.4. Vakuólumok a *S. pombe* hifasejtekben**

A CFCFDA a vakuólumokat teszi láthatóvá a *S. pombe* sejtjeiben. Ezt a festést annak érdekében végeztük el, hogy láthassuk, hogy a *S. japonicus*-hoz hasonlóan a micélium-képzés során kialakulnak-e poláris, óriás vakuólumok.

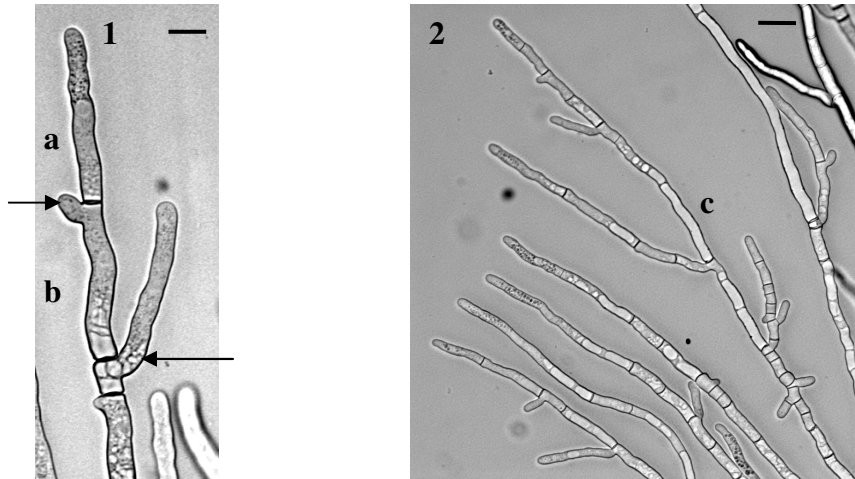
A 15. ábrán meghosszabbodott sejtekben és az agarba fúródó valódi hifákban intenzív fluoreszcens jelet láttunk. A meghosszabbodott sejtekben nem találtuk a poláris, óriás vakuólumokat. A hifasejtekben pedig hasonló jelintenzitást tapasztaltunk, mint a 15/1. ábrán bemutatott felvételen. A 15. ábrán bemutatott képek alapján azt feltételezzük, hogy ilyen szempontból nincs hasonlóság a két faj között.



**15. ábra** A *S. pombe* L975 hifasejtjeinek vakuólum festése CDCFDA-val. (1) A tárgylemez csatornájában lévő sejtek (2) az agarban kialakuló micélium. Méretvonalak: (1) 10  $\mu\text{m}$ , (2) 20  $\mu\text{m}$

#### **5.1.5. Vakuólum típusok *S. japonicus* hifasejtjeiben**

A *S. japonicus* hifáinak vizsgálatával egyértelműen kiderül, hogy a hifák növekedését a faj a vakuólumok méretének növelésével teszi gazdaságossá (Sipiczki és tsi, 1998b). A *S. japonicus* hifáiban eltérő méretű és alakú vakuólumokat találunk, melyek a hifák más-más régióinak jellegzetes kompartmentjei (16. ábra). A csúcsi részek kevésbé vakuolizáltak, itt nagyobb méretű vakuólumok nem fordulnak elő. Ovális, kerek, kis és közepes méretű vakuólumok leginkább a szubapikális régiókban figyelhetőek meg. Ahogy távolodunk a hifacsúcstól, úgy növekszenek a vakuólumok is: a tubuláris alakúak a távolabbi régiókban, az óriás vakuólumok pedig leginkább a hifák bazális részein találhatóak, poláris helyzetűek (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b).

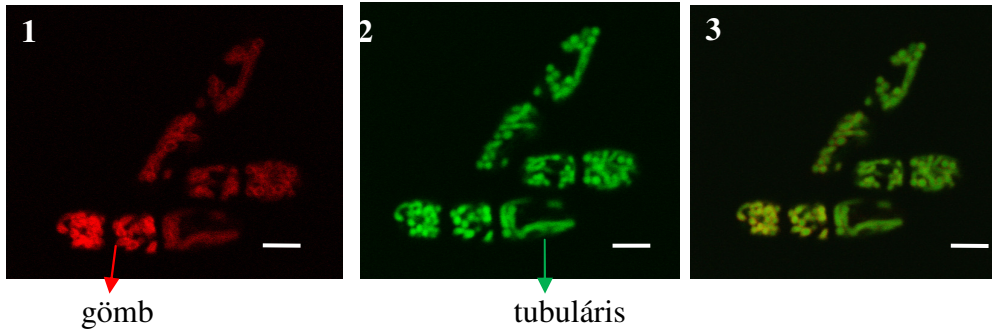


**16. ábra** Vakuólum típusok a *S. japonicus* hifáiban. Az 1. ábrán látható hifa csúcsi sejtjei (1a) citoplazmában gazdagok és kevésbé vakuolizáltak. Ezeket a sejt állapotától, az osztódás óta eltelt időtől függően citoplazmában szegényebb és vakuólumban gazdagabb sejt követi (1b). Olyan sejteket is láthatunk a képen, melyek az osztódást követően óriás vakuolumokat tartalmaznak és rendkívül kevés citoplazma állománnyal rendelkeznek (2c). Nyíllal jelöltük a szeptumok alól induló elágazásokat. Méretvonalak: (1) 10  $\mu\text{m}$ , (2) 20  $\mu\text{m}$

#### **5.1.6. A *S. japonicus* vakuólumainak vizsgálata fluoreszcens festékekkel**

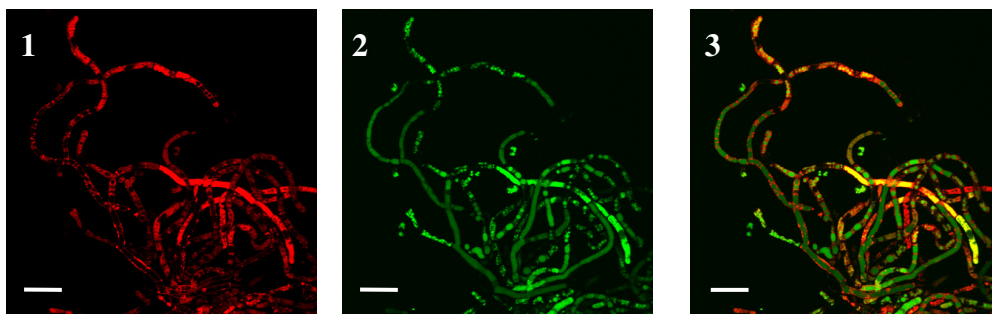
A *S. japonicus* invazív, elágazást tartalmazó hifáinak jellegzetes vakuólumait fluoreszcens festékek segítségével jellemeztük. Ha a sejteket egyidejűleg festjük a két fluoreszcens festékkel, jól láthatóan pirossal kirajzolódnak a vakuólumok körvonalai (FM4-64), míg a vakuólum membránon belüli teret a zöld színű CDCFDA teszi láthatóvá.

A vakuólumok alakja az élesztősejtekben is dinamikusan változik, a 17. ábrán láthatóan gömb alakútól a tubulárisig.



**17. ábra** A *S. japonicus* élesztősejtjei (1) FM4-64-gyel és (2) CDCFDA-val kezelve, (3) dupla festés. Méretvonal: 5  $\mu\text{m}$

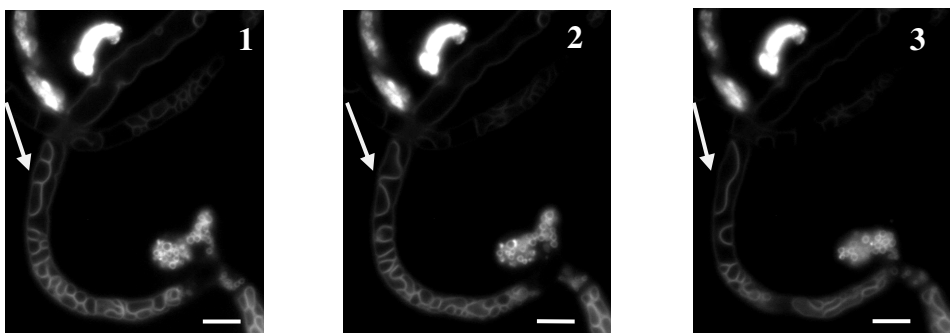
A *S. japonicus* tenyészetéből megpróbáltunk a felszín közelében lévő hifát festeni FM4-64-gyel és CDCFDA-val (18. ábra).



**18. ábra** A *S. japonicus* tenyészetének felszín közelében lévő hifáit festettük (1) FM4-64-gyel és (2) CDCFDA-val kezelve, (3) dupla festés. A nyíl mutatja a fúzionáló vakuólumokat. Méretvonal: 25  $\mu\text{m}$

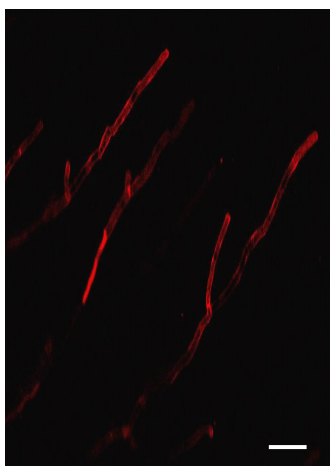
A képen látható, hogy a hifák a hozzáférés nehézségei miatt sérültek, ezért bizonyos régiókban erősen narancssárga festődés tapasztalható a sejt lízisének következtében. Ugyanakkor ezen az ábrán jól bemutatatható, hogy a kialakult óriás vakuólumok gyengébben festődtek, mint kisebb társaik.

Felszín közeli fonalak vizsgálata során figyeltük meg a 19. ábrán bemutatott vakuólum fúziót.



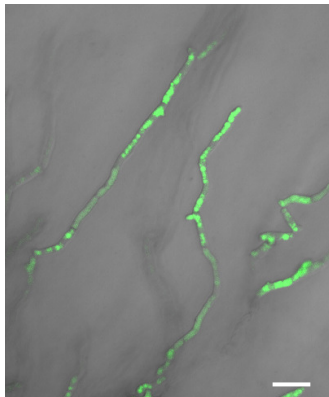
**19. ábra** Vakuólum fúzió a *S. japonicus* egyik hifasejtjében. A nyíl mutatja a fuzionáló vakuólumokat. Méretvonal: 10  $\mu\text{m}$

Kísérleteinket 10-14 napos tenyészetek vizsgálatával folytattuk tovább. Az agarba fúródott hifáink esetében a legeredményesebb módszer az agarszeletek festése volt. Mintáinkat az agarból kivágva nyertük, ezeket az agarkockákat inkubáltuk a festékekkel (20. és 21. ábra). Növekvő hifákat csak FM4-64-el festve azt tapasztaltuk, hogy a jellegzetes vakuoláris mintázat jól látható: a hifacsúcshoz közeli kisebb méretű és a távolabbi óriás vakuolumok körvonalai szépen megjelennek a képeken. Érdekes, hogy minden vizsgált hifacsúcson jól látható erős festődés tapasztalható.



**20. ábra** Különböző korú hifasejtek festődése *S. japonicus* 7-1 tenyészetében. Méretvonal: 20  $\mu\text{m}$

Az élesztősejtek és hifák festése során arra lettünk fegyelmesek, hogy a hifák CDCFDA-val jelölt óriás vakuólumai esetében kevésbé intenzív jelet kaptunk, mint amit a kisméretű vakuólumoknál megfigyeltünk.



**21. ábra** A vakuólumok eltérő festődése *S. japonicus* 7-1 hifáiban. A *S. japonicus* hifáit CDCFDA-val festve láthatjuk, hogy a nagyobb méretű vakuólumok kevésbé intenzív zöld színűek.

Méretvonal: 50  $\mu$ m

A másik különbség a festék bejutásának időtartama: az élesztősejteknek maximum 1 órás inkubálás elegendő, hogy a festék felvétele befejeződjön, eljusson a végső endocitotikus kompartmentig, míg a hifasejtek esetében ehhez 4-8 órás inkubálásra volt szükség.

## 5.2. Endocitózis

### 5.2.1. Endocitózis a *S. japonicus* sejtekben

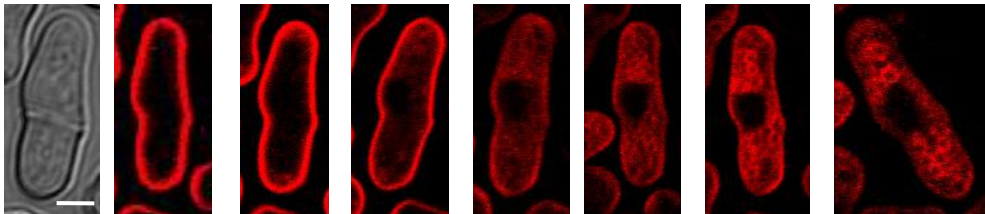
A *S. japonicus* élesztősejtjeinek endocitotikus útvonalát az FM4-64 fluoreszcens festék internalizációja révén követtük (22. ábra). A festék endocitózissal kerül felvételre és útja a plazmamembrántól egészen a vakuoláris membránig tart (Vida és Emr, 1995, Bone és tsi, 1998, Fischer-Parton és tsi, 2000).

Az felvételeken az FM4-64 felvételének jellegzetes szakaszait láthatjuk: már az első kép elkészítésekor, 1-2 perccel a festék hozzáadása után egyértelműen látható a plazmamembrán, majd 5-8 perc elteltével fluoreszcens foltok figyelhetőek meg a sejtek két végében, amelyek az endocitózis helyét, a növekvő sejtvégeket jelölik ki. Újabb 10 perc elteltével kisméretű korai és



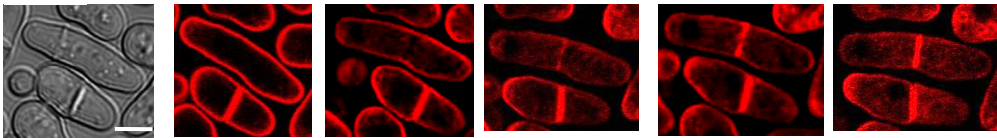
késői vezikulumokat, endoszómákat láthatunk a sejtvégek közelében. Egyre távolodva azoktól, kirajzolódnak a nagyobb méretű vakuólumok. Határozott körvonallal rendelkező vakuólumokat a festék hozzáadásától számított 39 perc, maximum 1 óra elteltével figyelhetünk meg. Osztódó sejtek esetében a festék akkumulációja nemcsak a két sejt-póluson hanem az ekvatoriális síkban is megfigyelhető, a kialakuló szeptum helyén.

1



4,5 perc 7,5 perc 16,5 perc 21 perc 25,5 perc 31,5 perc 39

2

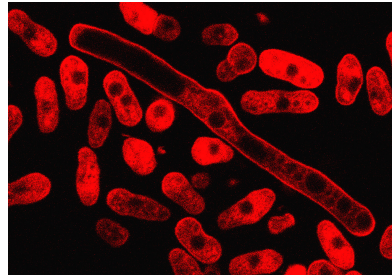
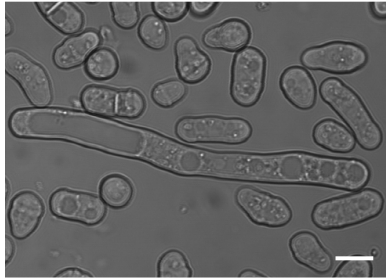


7,5 perc 21 perc 25,5 perc 31,5 perc 39

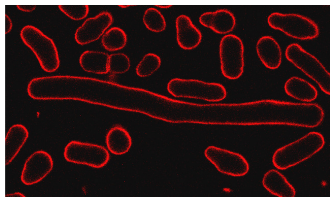
**22. ábra** Az endocitózis bemutatása *S. japonicus* 7-1-es törzsének élesztő sejtjeiben. Az 1. sorozat a *S. japonicus* bipolárisan növekvő élesztősejtjének FM4-64 felvételét, azaz endocitózisának útvonalt mutatja. A 2. képsoron pedig egy osztódó sejt festék felvétele és endocitózisa követhető nyomon. Méretvonalak: (1) 4  $\mu\text{m}$ , (2) 5  $\mu\text{m}$

Az endocitózis a meghosszabbodott *S. japonicus* élesztő sejtekben is nyomon követhető (23. ábra). A megfigyelt sejt mindkét végén láthatóak a fluoreszcens foltok, kisebb mértékben a kevesebb citoplazmát és a nagy vakuólumot tartalmazó oldalon és nagyobb mértékben a citoplazmában gazdagabb végen.

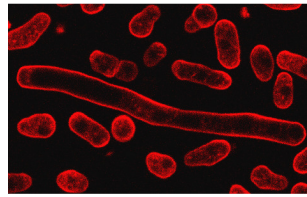




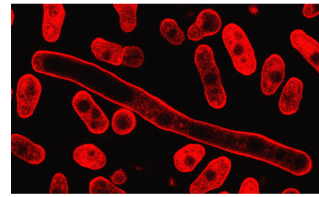
1 óra 13 perc



5 perc



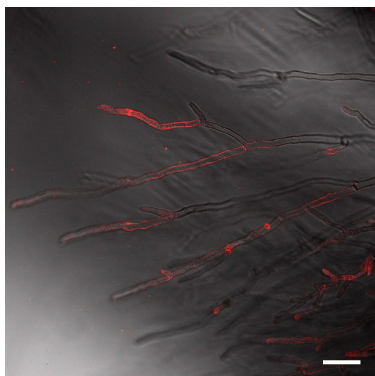
29 perc



58 perc

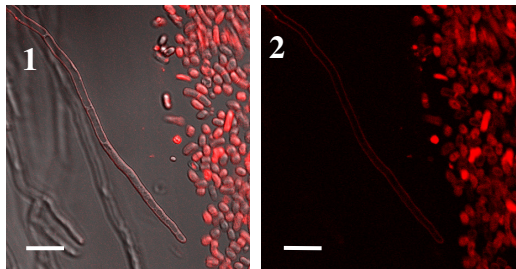
**23. ábra** Az élesztő-hifa átalakulás kezdeti stádiumában lévő sejt FM4-64 felvételének lépései az idő függvényében. Méretvonal: 7  $\mu\text{m}$

A hosszú festődési idő az egyik ok, ami miatt a hifákban a festékfelvételt nem tudtuk nyomon követni. A kivágott agarkockák vastagsága eltérő volt, ezért bizonyos fonalak előbb, míg mások később festődtek, ezért nem tudunk a felvételtől pontos információval szolgálni. Azt több esetben is láttuk, hogy a plazmamembrán nagyon rövid idő alatt festődött (7-10 perc, 24. ábra), de ezt követően nincs adatunk az endocitózis további lépéseiről. Csak a végső fázist és az ahhoz szükséges időt tudjuk megbecsülni adataink alapján.



**24. ábra** FM4-64 felvételének kezdeti stádiuma a *S. japonicus* 7-1 hifáiban. Méretvonal: 50  $\mu\text{m}$

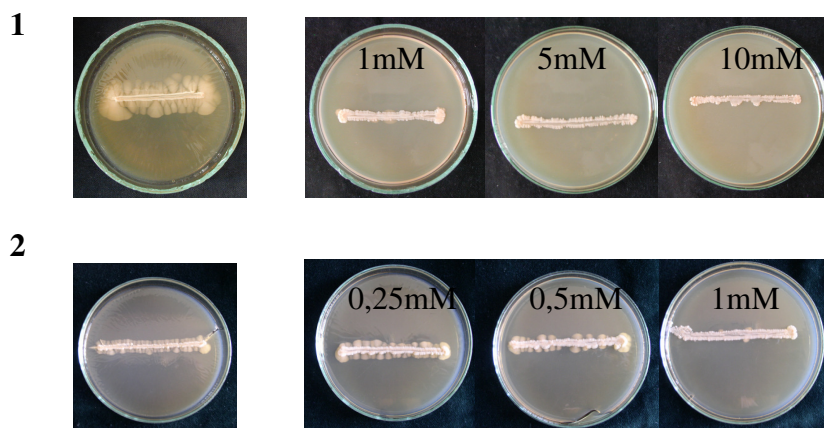
A speciális tárgylemezben a két lyukon adagolt festék sem segített az endocitózis nyomon követésében. Azt gondoljuk, hogy az inokulum nyílásához közel eső élesztősejtek felvették a festék jó részét, így az nem kellő mennyiségben jutott el a távolabb lévő hifasejtekhez (25. ábra).



**25. ábra** FM4-64 felvétele a tárgylemezben növekvő *S. japonicus* 7-1 tenyészeténél. Méretvonal: 20  $\mu\text{m}$

### 5.3. Farnezol hatása az élesztő-micélium átalakulásra a *S. japonicus*-nál

A farnezol az úgynevezett „quorum sensing” molekulák közé tartozik. Ez az egyik olyan kismolekulájú vegyület (amely a Chanel No. 5 parfüm egyik összetevője is), amely befolyással bír a tenyészet növekedésére, a patogén fajok virulenciájára, a *C. albicans* esetében pedig gátolja az élesztő-micélium átalakulást (Hornby és tsi, 2001, Nickerson és tsi, 2006). Kísérletünkben vizsgáltuk a farnezol a *S. japonicus* 7-1-es, vad típusú törzsének micélium-képzésére gyakorolt hatását (26. ábra).



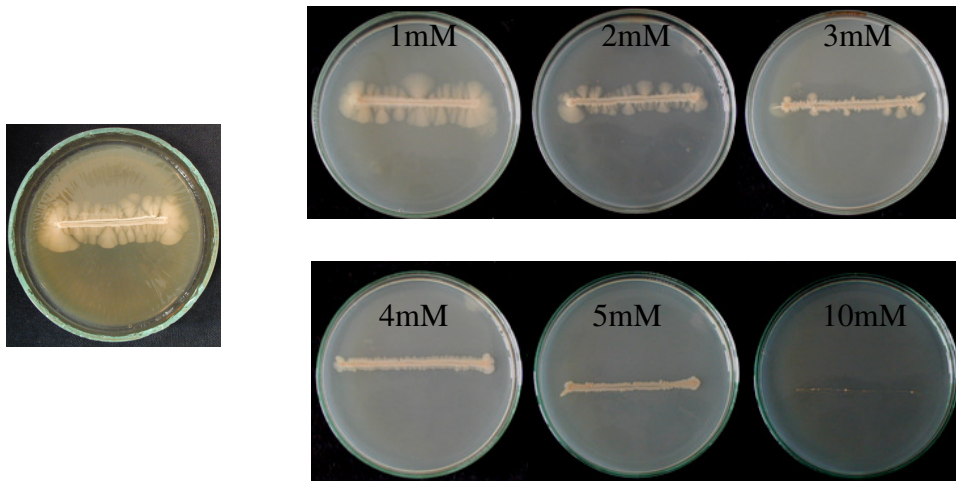
**26. ábra** A farnezol micélium-képzést gátló hatása a *S. japonicus* 7-1 törzs esetében.

Már 1 mM-os koncentrációban is majdnem tökéletes mértékben gátolta a micélium-képzést. A következő alkalmazott koncentrációnál, 5 mM, micélium nem alakult ki. Másik kísérletünkben 1 mM volt a maximális koncentráció, a micélium növekedést pedig 12 nap után vizsgáltuk. Megállapítható, hogy a farnezolt 1 mM-os koncentrációban tartalmazó komplett táptalajon a hifa növekedés már csak három pontról indult meg és a kialakult fonalak is rövidebbek voltak a kontrol csészén mérthez képest. A fokozatosan csökkenő koncentráció a hifa növekedés egyre több pontból történő megindulását és a hosszabb micélium kialakulását engedte meg.

#### **5.4. Acetil-szalicilsav (aszpirin) hatása az élesztő-micélium átalakulásra a *S. japonicus*-nál**

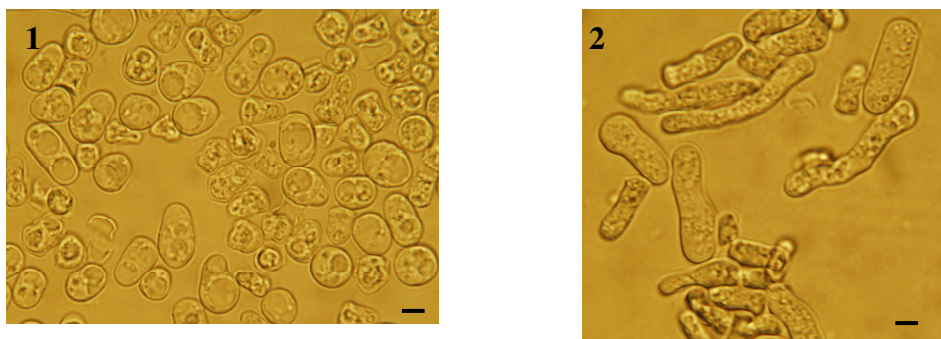
A patogén gombafaj *C. albicans* esetében bebizonyították, hogy a ciklooxygenáz inhibitorok: aszpirin, etodolac, diclofenac, celecoxib, nimesulide, ibuprofen és meloxicam gátolták a biofilm kialakulását, valamint befolyásolták az élesztő-micélium átalakulást (Alem és Douglas, 2004). Emlősökben a ciklooxygenáz enzimek (COX-1 és COX-2) a foszfolipidek prosztaglandinná alakításában vesznek részt, mely vegyületek sokrétű biológiai aktivitással rendelkeznek, mint például a gazdaszervezet immunválaszának befolyásolása (Noverr és Huffnagle, 2004). A *C. albicans* és a *Cryptococcus neoformans* egyaránt termelnek prosztaglandinokat, azonban ez utóbbi gombákban betöltött szerepéről nagyon keveset tudunk (génregulátorként, vagy akár virulencia faktorként is működhetnek). A ciklooxygenáz gátlók (pl. aszpirin) jelentősége abban rejlik, hogy ismert antifungális szerekkel kombinálva hasznossá válhatnak a terápiás kezelések során.

Kísérletünkben vizsgáltuk az aszpirin vad típusú *S. japonicus* törzsünk élesztő-micélium átalakulására gyakorolt hatását (27. ábra).



**27. ábra** Az acetil-szalicilsav hatása a *S. japonicus* 7-1 törzsének micéliumképzésére.

Az élesztő-micélium átalakulást már a 2mM-os aszpirin koncentráció is redukálta, azonban a tenyészet periferiáján helyenként még megfigyelhető volt az átváltás. A növekvő mennyiségben alkalmazott aszpirin 4 mM-os koncentrációjánál minimális volt, 5mM-os koncentrációjánál pedig megszűnt a hifanövekedés. Az élesztők még képesek voltak gyenge szaporodásra ezeknél a koncentrációknál. 10mM-os koncentráció az élesztősejtek növekedésének leállításához és pusztulásához vezetett. Mikroszkóp alatt a 28. ábrán bemutatott változásokat figyelhettük meg.



**28. ábra** A *S. japonicus* 7-1 élesztősejtjei (1) 0 mM és (2) 10 mM acetil-szalicilsav jelenlétében. Méretvonal: 5  $\mu$ m.

Előregedett élesztősejteket láthattunk a kontrol telep közepéből vett, 14 napos tenyészet mintájában. A maximálisan alkalmazott 10mM-os koncentrációnál a tenyészetben nagyon kis számban láttunk élő sejteket, leginkább meghosszabbodott, elpusztult sejtek vázát találtuk.

### **5.5. *Schizosaccharomyces japonicus* micélium-képzésben sérült mutáns törzseinek izolálása, genetikai analízise és jellemzése**

Ahhoz, hogy a micélium-képzésben szerepet játszó génekről minél több információt megtudjunk, micélium negatív törzsek izolálását és rekombinációs analízisét tűztük ki célul. Feltételeztük, hogy e jelleg háttérében azoknak a géneknek a mutációja áll, amelyek részt vesznek az élesztő-micélium átalakulás során lejátszódó folyamatokban.

Vizsgálataink szerint a *S. japonicus* a később megismert *S. pombe* micélium-képzésével szemben megtartotta azt az előnyét, hogy az élesztő-micélium átalakulás könnyebben indukálható, a micélium-képzés gyorsabban lejátszódik és a feltételek is egyszerűbben biztosíthatóak.

A *S. japonicus* genomszekvenciájának megismerésével ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces\\_group/GenomesIndex.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/GenomesIndex.html)) pedig molekuláris biológiai eszközkészletének „hátránya” is csökkenni fog (Furuya és Niki, 2009).

#### **5.5.1. *S. japonicus* morfológiai mutáns (*myc<sup>-</sup>*) törzsek izolálása**

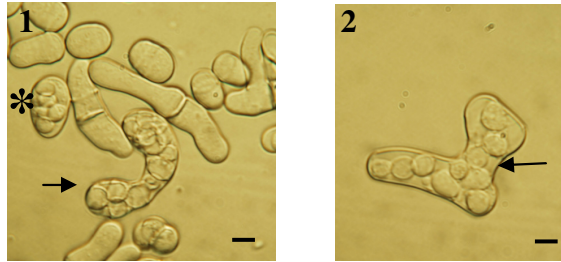
Az azonos idő alatt képzett micélium mérete és sűrűsége alapján három mutáns csoportot különböztettünk meg, amit a 3.2.8.2. fejezet 1. ábráján mutattunk be. A további izolálás és szelekció során olyan mutánsokat kerestünk, melyek auxotrófiájukat megtartották, ám micéliumot nem fejlesztettek, azaz a bemutatott harmadik csoportba tartoznak. Azért tartottuk ennek a *myc<sup>-</sup>* fenotípusnak a vizsgálatát kiemelten fontosnak, mert a mutáció háttérében álló gén sérülése nemcsak részlegesen gátolta, vagy felgyorsította,

hanem egyértelműen megakadályozta az élesztő-micélium átalakulást. Kísérleteink során a harmadik csoportba tartozó, részben korábban, részben általunk ennek a programnak a kereteiben izolált *myc<sup>-</sup>* mutánsok genetikai analízisét végeztük el.

A tanszéki törzsgyűjteményben három *myc<sup>-</sup>* törzs (7-63, 7-96, 7-147) szerepelt (Bozsik és tsi, 2002). E három mutáns mellé további 8 mutáns törzset izoláltunk. Többszörös kontrol tesztek után a következő tíz micélium-képzésre képtelen törzset választottuk további vizsgálataink alanyainak: 7-63, 7-96, 7-148, 7-154, 7-155, 7-156, 7-157, 7-159, 7-163, 7-176 (a vastagon szedett törzskönyvi számok az újonnan izolált micélium negatív törzseket jelentik). A 7-147-es mutáns az újabb vizsgálatok eredményei szerint utólag elvesztette *myc<sup>-</sup>* tulajdonságát.

### **5.5.2. Keresztezés vad típusú törzssel: Back cross**

Mutánsaink mindegyikét protoplaszt fúzióval kereszteztük olyan micélium-képzésre nézve vad típusú törzssel, amely auxotrófiája komplementer volt a mutánséval (7-80 *ura<sup>-</sup>*, 7-131 *ade<sup>-</sup>*). A heterozigóta fúziós termékek spóráztató táptalajon azigotikus aszkuszokat képeztek (29/1. ábra). Az ilyen aszkuszokból kiemelt oktádokban mindegyik esetben micélium-képzésre nézve 4 *myc<sup>-</sup>* : 4 *myc<sup>+</sup>* szegregációs mintázatot kaptunk, ami azt jelzi, hogy a mutánsok valóban egyetlen génben sérültek. Érdekesség, hogy az idősebb spórázó tenyészetekben nemcsak 6-8 spórási aszkuszok akadtak, hanem 14-16 spórási tartalmúak is (29/1-2. ábra). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a diploid sejtek egymással fuzionáltak és tetraploid zigótákat hoztak létre. A tetraploid zigótákban lezajlott a spóráképzés, melynek eredménye e nagyszámú spórák megjelenése az aszkuszokban.



**29. ábra:** Azigotikus aszkuszkok és zigotikus óriásaszkuszkok a mutánsok és a vad törzsek fúziójával létrehozott diploidokban. Csillag jelöli az azigotikus ( $2n$ ) aszkuszt. Nyílhegy jelöli a zigotikus ( $4n$ ) aszkuszkokat. Méretvonal:  $5\ \mu\text{m}$

### 5.5.3. Rekombinációs analízis

Kísérleteinket a mutánsok egymás közötti keresztezéseivel folytattuk, annak érdekében, hogy kiderüljön vajon a mutánsok azonos vagy eltérő génekben sérültek. Törekedtünk arra, hogy az összes lehetséges párosításban elvégezzük a keresztezést. Mivel a keresztezések protoplaszt fúzióval történtek, a párosítások feltétele az volt, hogy a keresztezendő mutánsok eltérő auxotrófiával rendelkezzenek. Azokban az esetekben pedig, amelyekben az azonos auxotróf marker akadályozott bennünket a párosítások elvégzésében, auxotróf markerét tekintve rekombináns törzseket használtunk (ezeket az auxotrófiájukban eltérő ám az eredeti  $myc^-$  mutációt hordozó, micélium negatív törzseket az adott mutáns és egy vad típusú, értelemszerűen más auxotróf markerrel rendelkező törzs fúziójából származó rekombináns spóráklónok szelekciójával nyertük), vagy az elvégzett kísérleteink alapján feltételeztük a  $myc^+$  utódok lehetőségét. Például nem végeztük el a két leucin auxotróf törzs 7-63 és 7-155 keresztezését, de a kapott adataink alapján láttuk, hogy a 7-155x7-157 keresztezésben  $myc^+$  rekombinánsot kaptunk, ami azt jelenti, hogy a 7-155 törzs mutációja eltér a 7-157-es törzs mutációjától. Ez pedig azt jelenti, hogy nem tartozik egy csoportba a 7-156-os, 7-96-os és 7-63-as törzsekkel sem.

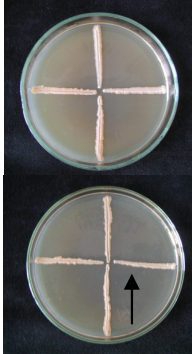
A protoplaszt fúzió eredményeként, minden párosításnál több diploid fúziós terméket izoláltunk és spóráztattunk. A mikromanipuláció során elkülönített spóráklónokat izoláltuk, majd meghatároztuk auxotrófiájukat és micéliumképzési jellegeiket. Eredményeinket a 30-32. ábrákon és a Melléklet 1-2. táblázataiban foglaltuk össze.

Két micélium-negatív törzs keresztezésekor egy adott oktádból származó spórákból felnövekvő telepek vagy csak  $myc^-$ , vagy különböző arányban  $myc^-$  és  $myc^+$  (rekombináns) fenotípussal rendelkezhetnek. A micélium negatívak vagy az egyik, vagy a másik szülői jelleget örökölt mutánsok lehetnek, vagy dupla mutációt hordozó rekombinánsok. Ez utóbbi genotípust molekuláris biológiai adatok hiányában, és a hifa növekedés alapján fenotípusosan, nem tudjuk beazonosítani. Azonban az oktád többi spórájából felnövekvő telep fenotípusa alapján feltételezhetjük, hogy két mutációt is hordoznak. Például egy teljes oktád egyik tagja vad típusú, akkor az egyik  $myc^-$  spórának dupla mutánsnak kell lennie.

Amennyiben egy keresztezésben az összes, kihúzott oktád vizsgálatát követően egyetlen alkalommal sem találtunk olyan spórából felnövekvő telepet, amely körül micélium alakult ki, azt feltételeztük, hogy a két szülői törzs azonos génben sérült.  $Myc^+$  spóra képződése esetében pedig úgy gondoljuk, hogy különböző génekben bekövetkezett mutációk okozzák a micélium képzés képességének elvesztését a keresztezett törzsekben.

A vizsgált oktádjaink között kaptunk csak szülői fenotípust mutató 8  $myc^-$  : 0  $myc^+$  oktádokat. Az azonos génben sérült mutánsok esetében csak ilyen oktádokat láttunk. Ez azt jelentette, hogy a 8  $myc^-$  utód a két szülő genotípusát 4  $myc^-$  : 4  $myc^-$  arányban hordozta (30. ábra).





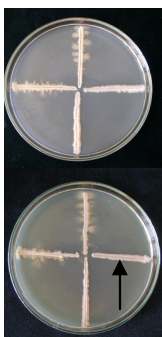
2: 63x157-es keresztezés 5. számú aszkuszának bemutatása							
5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g	7-157
myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>
leu-	ura-	leu-	ura-	ura-	leu-	leu-	ura-

**30. ábra** Azonos génben sérült mutánsok keresztezéséből származó spóráklónok. (1) A két csészén a 63x157 törzsek keresztezéséből izolált spórákból képződő telepek (csak 7 spóra képzett telepet: 5a-g) 21 nap inkubálás után sem képeznek hifát. A 7-157-es mutánst nyíllal jelöltük.

(2) A 63x157 törzsek keresztezéséből származó 5. számú aszkusz spóráiból felnövekvő telepek micélium-képzése és auxotrófiája.

Eltérő génben sérült mutánsok keresztezésekor is kaptunk olyan oktádokat, ahol egyik spóra sem volt képes micélium fejlesztésére. Ugyanakkor ettől eltérő oktádokat is megfigyeltünk. Kaptunk 4 myc<sup>+</sup> : 4 myc<sup>-</sup> szegregációt mutató oktádokat is (31. ábra). Ezekben az oktádokban mindegyik spóra rekombináns lehetett. A 31. ábrán látható csészeképeken is az oktád 7 spóráklónjából felnövekvő telepeket tudtuk bemutatni. Ebben az esetben a nyolcadik spórából képződő telep fenotípusát a hét másik telep fenotípusa alapján meghatározhatjuk. A *S. japonicus* oktádjai ugyanis úgy alakulnak ki, hogy a zigóta meiosisát követően lejátsszódik egy mitózis, amely eredményeként, páronként azonos genotípusú spórák jönnek létre az aszkuszon belül. A vizsgált nyolc spórák oktád pedig parentális ditípusú (esetünkben ez 8 myc<sup>-</sup> spórákat jelent), tetratípusú (esetünkben ez 6 myc<sup>-</sup> : 2 myc<sup>+</sup> spórákat jelent), vagy nem parentális ditípusú (esetünkben ez 4 myc<sup>-</sup> : 4 myc<sup>+</sup> spórákat jelent) lehet. A 7 spórából felnövekvő telep fenotípusa alapján

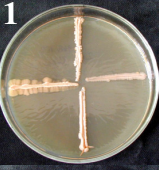

így elegendő információnk van ahhoz, hogy következtessünk a nyolcadik spóra genotípusára. A 31. ábrán bemutatott aszkusz nyolcadik spórája  $myc^-$ .



2: 159x157-es keresztezés 7. számú aszkuszának bemutatása							
7a	7b	7c	7d	7e	7f	7g	7-157
$myc^+$	$myc^+$	$myc^-$	$myc^-$	$myc^+$	$myc^+$	$myc^-$	$myc^-$
liz-	ura-	ura-	liz-	liz-	ura-	liz-	ura-

**31. ábra** Eltérő génekben sérült partnerek keresztezéséből képződött oktád. (1) 159x157 törzsek keresztezéséből származó 7. számú nem teljes oktád 7 életképes spórával. A 7-157-es törzset nyíllal jelöltük. (2) A 159x157 törzsek keresztezéséből származó 7. aszkusz spóráiból felnövekvő telepek micéliumképzése és auxotrófiája.

Olyan oktádokkal is találkoztunk, amelyekben a szegregáció  $6 myc^- : 2 myc^+$  volt (32. ábra). Ezekben az esetekben arra gondoltunk, hogy a szegregáció oka lehetett crossing over, vagy génkonverziós nem reciprok rekombinációs esemény. Előbbi esetben a  $6 myc^-$  utódból kettő rekombináns, dupla mutáns, míg 4 szülői  $myc^-$  genotípust hordoz  $2:2$  arányban. Így a szülői allélok  $4:4$  arányban képviseltek. Az utóbbi génkonverziós esemény akkor jön létre, ha a kialakuló Holliday struktúra feloldása crossing over nélkül jön létre, ekkor a heteroduplexben a hibás bázispárosodás javítása vagy az egyik, vagy a másik allél irányában történhet.

1	2.148x163-es keresztezés 2. aszkuszanak bemutatása							
	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h
	myc <sup>-</sup>	myc <sup>+</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>+</sup>	myc <sup>-</sup>	myc <sup>-</sup>
	ura-	arg-	arg-	ura-	arg-ura-	prot*	prot*	arg-ura-

**32. ábra** Eltérő génekben sérült partnerek keresztezéséből képződött oktád.  
 (1) A 148x163 törzsek keresztezéséből származó 2. számú teljes oktád 8 életképes spórával. (2) A 148x163 törzsek keresztezéséből származó 2. aszkusz spóráiból felnövekvő telepek micélium-képzése és auxotrófiája (prot\* a prototróf telepeket jelöli).

6 myc<sup>+</sup> : 2myc<sup>-</sup> jellegű oktádot nem kaptunk. Ez az ún. diszparzítás jelenségének is betudható. Génkonverzió esetén vagy az egyik, vagy a másik allélhoz történik a hibás bázispárosodás javítása. Azonban, mint esetünkben is bebizonyosodott az egyik allél előnyben részesül a másikkal szemben.

A Melléklet 1-2. táblázataiban összefoglalt eredményekből láthatjuk, hogy három párosítás esetében nem kaptunk myc<sup>+</sup>, rekombináns spórákat. Minden vizsgált spórából felnövekvő telep micélium negatív volt. Ezek a következők voltak: 7-157x7-63, 7-156x7-157, 7-182x7-156. A spóra-életképesség a keresztezésekben az átlagoshoz volt hasonló. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a három törzs azonos génben sérült.

A Melléklet 2. táblázatában a 7-96-os mutáns egyetlen keresztezése szerepel. A további párosításokat azért nem végeztük el, mert a 7-96-os mutáns Bozsik és társai 2002-es cikke alapján, a 7-63-as mutánssal azonos

gében sérült. A 159x96-os keresztezést a 7-159-es mutáns további vizsgálata érdekében végeztük el.

A Melléklet 2. táblázatában feltüntettük az egyes keresztezések esetén kihúzott oktádok számát, valamint a teljes oktádokat (mind a nyolc spóra telepet képez). A számokból látható és általánosságban elmondható, hogy kis számú komplett oktáddal dolgozhattunk. Ebben a táblázatban a nyolc spórás aszkuszokból kihúzott oktádok száma mellett található a spóra-életképességet jelző adatokat is. Ez az információ az oktádok 8 spórájából életképes, telepet képző spórák arányára utal. Egyetlen keresztezés esetében kaptunk 100%-ot megközelítő értéket (157x154). A legtöbb párosításnál 60-85%-os életképességet mértünk (az átlagos életképesség 71,9 %). 90%-ot meghaladó, magas életképességet a 157x163 (90,4%), 154x157 (97%) keresztezésekben kaptunk. Mindkét keresztezésben a 7-157-es mutáns vesz részt, ezért megvizsgáltuk a többi keresztezést is, ahol ez a mutáns szerepelt. A spóra-életképesség szempontjából a 7-157-es párral történő keresztezések 73-97%-osnak, tehát az átlagosnál magasabbnak bizonyultak.

Három keresztezés esetén kaptunk 60%-nál kisebb értéket: 176x63 (52,1%), 156x159 (57,5%) és 155x159 (58,3%). Ha a táblázatban megvizsgáljuk a három párosításból kettőben részt vevő 7-159-es mutáns további párosításait, láthatjuk, hogy keresztezésével olyan oktádokat kaptunk, amelyekben a spóra-életképesség alacsony, vagy átlagos volt: 148x159 (60%), 159x163 (60,8%), 154x159 (63,2%), 159x96 (66,9%), 159x176 (68,1%), 159x63 (68,6%) és 157x159 (76,6%). Ezek közül a 157x159-es keresztezésben kaptuk a legmagasabb életképességet, ami feltételezhetően a pár másik tagjának tudható be. Az összes, kihúzott oktád vizsgálata alapján azt figyeltük meg, hogy ha több a vizsgált oktádok száma néhány kivételtől eltekintve az életképesség adatok is magasabbak. Ha ezt is figyelembe vesszük a 159-es mutáns párosításainál, akkor a 148x159 és a 156x159

keresztezéseket a kevés vizsgált aszkusz miatt kivehetjük a további elemzésekből.

A kihúzott oktádok számának növelése és az életképesség javulása alól kivétel a 176x63-as keresztezés. A legkevesebb felnövekvő telepet ebben a párosításban kaptuk (52,1%). Ez azt jelentette, hogy a kihúzott 23 oktád 8-8 spórájából 4-4 fejlesztett telepet. Szintén alacsony spóra-életképességet tapasztaltunk 16 kihúzott oktád esetében a 148x176-as keresztezésekben. A tapasztalt alacsony életképesség egyik lehetséges magyarázata a 7-176-os mutáns gyenge életképessége lehet.

A  $myc^+$ , rekombináns spórák arányának elemzésekor a legmagasabb értéket a 154x159-es párosításnál kaptuk (53,5%). Szintén 30% fölötti a  $myc^+$  spórák aránya a 63x159, 96x159, 148x156, 155x159, 156x159, 157x159, 157x163, 159x163 és a 159x176-os keresztezésekben. Viszonylag kevés, 5-5 kihúzott oktáddal dolgoztunk a 148x156 és 156x159-es keresztezésekben, ezért ezek elemzésétől a továbbiakban ilyen szempontból eltekintünk. Megvizsgálva a rekombináns spórák számát a 7-159-es mutáns keresztezéseiben láthatjuk, hogy a legtöbb alkalommal magasabb 30%-nál (kivétel a 148x159, ebben az esetben 6 oktáddal dolgoztunk). A 7-159-es törzs keresztezéseinél megfigyelt alacsony spóra-életképesség a spórák 25-40%-ának pusztulását jelzi. Az ezzel párhuzamosan mért legtöbb alkalommal az átlagosnál magasabb  $myc^+$  spórák arányából arra következtethetünk, hogy az oktádokban található, bizonyos genotípusú spórák nem voltak életképesek. Mivel a szülői genotípust hordozó mutánsok és a rekombináns,  $myc^+$  spórák is életképesek, azt gondolhatjuk, hogy a két szülői mutációt együtt hordozó spóra nem növesztett telepet. Ez jellemző lehet a 154x159, 155x159, 163x159-es keresztezésekre (a 148x159 és 156x159-es keresztezéseknél a vizsgált spórák száma alapján ilyen következtetést nem vontunk le). A 63x159, 96x159, 157x159 és a 176x159-es párosítások további vizsgálatokat igényelnek.

Szintén magas rekombináns spóraszámot kaptunk a magas életképességet mutató 157x163-as keresztezésben. A 90,4%-os életképesség azt jelenti, hogy minden 10. vizsgált spóra pusztult csak el. A magas rekombináns *myc*<sup>+</sup> arányból pedig arra következtethetünk, hogy a legtöbb kapott spóra rekombináns vad típusú volt és az előzőekben felsorolt keresztezésekkel ellentétben a dupla mutáns is életképesnek bizonyult.

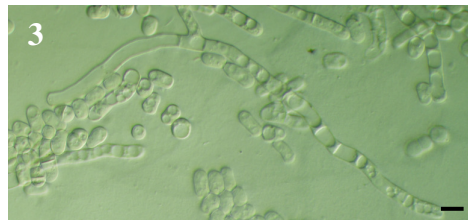
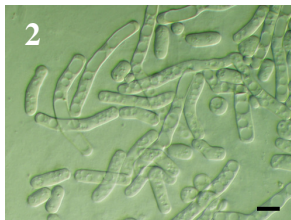
A vad típusú rekombináns spórák száma a következő keresztezésekben nem érte el a 11%-ot: 156x176 (7,4%), **163x63** (7,6%), **154x155** (10,5%) és **148x154** (10,8%). A 156x176-os keresztezés esetében kevés spórát vizsgálhattunk, így ebből az értékből a *myc*<sup>+</sup> spórák jelenlétén kívül, további következtetést nem vonhatunk le. A fennmaradó három (vastaggal szedett keresztezések) eset érdekessége az volt, hogy az egymással keresztezett mutánsok mikroszkópos vizsgálataink alapján (lásd: 5.5.4.1.1. és 5.5.4.1.2. fejezet) hasonló morfológiai és citológiai jellegekkel rendelkeztek. Ez alapján pedig feltételezhető volt, hogy a pároknál a mutációt azonos gének hibái okozzák, ezért keresztezésenként az átlagosnál több oktádot húztunk ki. Mindhárom párosítás esetében találtunk olyan oktádokat, amelyekben a spórák között rekombináns, *myc*<sup>+</sup>-ok is voltak, tehát feltételezhetően mutánsaink különböző génekben sérültek. A *myc*<sup>+</sup> spórák alacsony arányú megjelenése a rekombináció kis gyakoriságával, azaz a gének esetleges kapcsoltságával magyarázható. Ez azt jelentené, hogy a 7-148, 7-154, 7-155 mutánsok egy, a 7-163, 7-63 (és így a 7-96 mutáns is) pedig egy másik kapcsoltsági csoportot alkotnak.

#### 5.5.4. Micéliális mutánsok sejttani jellemzése

Az UV mutagenézissel előállított mutánsaink mikroszkópos vizsgálata során több, a *myc<sup>-</sup>* fenotípushoz társuló jellegre lettünk figyelmesek. Ezeket a tulajdonságokat a Melléklet 3. táblázatában foglaltuk össze.

##### 5.5.4.1. Az élesztősejtek alakjában bekövetkezett változások

A vad típusú törzs fiatal, 24 órás, YEL-ben rázatott, tenyészetében ovális, hosszúkás élesztősejtek találhatóak (33. ábra). Szilárd táptalajon (YEA) vizsgálva az élesztősejtek alakjában végbemenő változásokat, láthatjuk, hogy a 3-6 napos tenyészetben már megindul az az átalakulás, melynek eredménye a sejtek megnyúlása, poláris növekedés és a valódi hifák megjelenése. Ebben a tenyészetben a lekerekedő, hosszúkás élesztősejtek mellett meghosszabbodott sejteket, a tenyészet széléről vett mintában pedig kisméretű hifákat láthatunk (33. ábra).

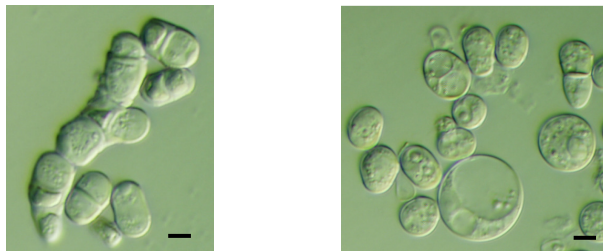


**33. ábra** A *S. japonicus* vad (7-1) típusú törzsének (1) 24 órás és (2,3) 3 napos tenyésze. Méretvonalak: 5  $\mu\text{m}$  (1), 10  $\mu\text{m}$  (2, 3)

Mutáns törzseink esetében a szilárd táptalajon láttuk, hogy ez az átalakulás elmarad. Munkánk további részében a mutáns tenyészetek mikroszkópos vizsgálata során az élesztő sejtalakban bekövetkező változások mellett a hifázás szempontjából alapvető sejtpolaritás alakulását, a vakuólum képzést és a sejtfal szerkezetének változását vizsgáltuk.

#### 5.5.4.1.1. sep-szerű növekedés

A *S. japonicus* vad típusú törzsének tápoldatban növesztett, exponenciális fázisában lévő tenyészetében az élesztősejtek a szeptum képzést követően elválnak egymástól, a következő osztódás csak ezt követően indul meg. A 7-63, 7-96, 7-156, 7-159, 7-163 törzskönyvi számmal jelzett mutánsok exponenciális fázisban lévő tenyészetében (YEL) a 34/1. ábrán az osztódás után együtt maradó leánysejteket láthatunk. Az így kialakult sejtláncok akár 6-8 sejtből is felépülhetnek. Ezek a sejtláncok nem azonosak a *S. japonicus* szilárd táptalajon képzett valódi hifáival, hiszen emlékezzünk csak arra, hogy a szelekció során épp a micélium negatív törzseket válogattuk ki. Ez a jelenség a *S. pombe sep1-1* mutáns törzsének mikrohifáira (Sipiczki és tsi, 1993) emlékeztet, ezért az ilyen fenotípust „sep-szerűnek” neveztük el. Ha ugyanezen mutánsok 6 napos szilárd táptalajon (YEA) növekedő tenyészetét vizsgáljuk (34/2. ábra), eltérő képet látunk a mikroszkóp alatt. A sejtláncok felbomlanak, a sejtek lekerekednek. Két mutáns esetében (7-63 és 7-96) számos óriás sejt is megjelenik a tenyészetben, amelyben extrém méretű vakuólum alakult ki.



**34. ábra** A 7-63-as mutáns exponenciális és stacioner fázisban lévő tenyészetete. (1) Osztódás után együtt maradó sejtek alkotta mikrohifa az exponenciális fázisban lévő tenyészetben. (2) Lekerekedett sejtek és óriás méretű, nagy vakuóllummal kitöltött sejtek a stacioner fázisú tenyészetben. Méretvonalak: 3  $\mu$ m.

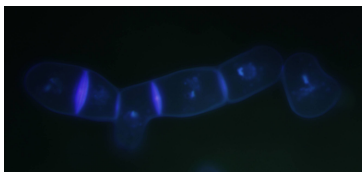


Ha kalkofluorral festjük a tápoldatban szaporodó tenyészetet, a sep-szerűen növekvő mikrohifák tagjainak száma is jól kivehetővé válik (35. ábra). Amint azt a *S. pombe sep1-1* mutáns törzsére is igaz: ezek a mikrohifák nemcsak a szabadon álló sejtvégen növekednek, hanem a közbülső sejtek révén, a szeptumok alatti elágazások létrehozásával is.



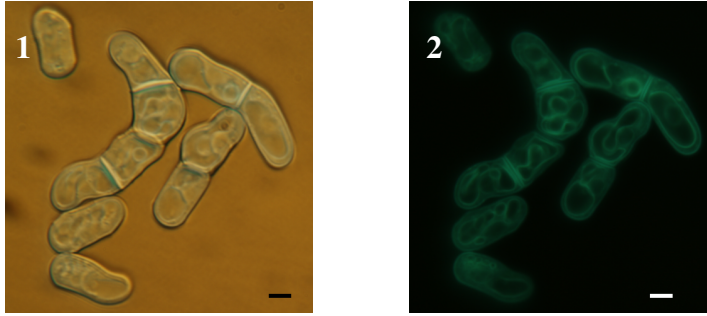
**35. ábra** Mikrohifák a 7-159-es mutáns exponenciális fázisban lévő tenyészetében. (1) Fénymikroszkópos morfológia (2) ugyanazon sejtek kalkofluorral festve. Méretvonalak: 3  $\mu\text{m}$

A mikrohifák esetében kíváncsiak voltunk arra, hogy minden egyes sejt tartalmaz-e sejtmagot, vagy az osztódások után sejtmagot nem örökölt hifatagok jöttek létre. Ezért tenyészetünket DAPI-val festettük (36. ábra).



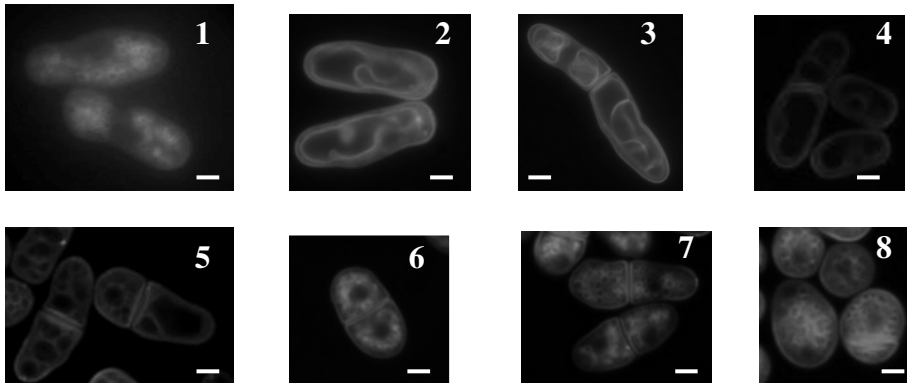
**36. ábra** DAPI-val és kalkofluorral festett mikrohifa a 7-159-es mutáns exponenciális fázisban lévő tenyészetében. Méretvonal: 2  $\mu\text{m}$

A sep-szerű növekedést mutató 7-163-as mutáns másik érdekessége a sejteken belül kialakuló vakuoláris hálózat szabálytalansága (37. ábra).



**37. ábra** Mikrohifa és vad típusú sejtek a 7-163-as mutáns exponenciális tenyészetében. (1) Fénymikroszkópos morfológia. (2) MDY-64 festett sejtek morfológiája. A törzs jellegzetessége, hogy szabálytalan, nagyméretű vakuólumokat tartalmaz. Méretvonal: 3 µm

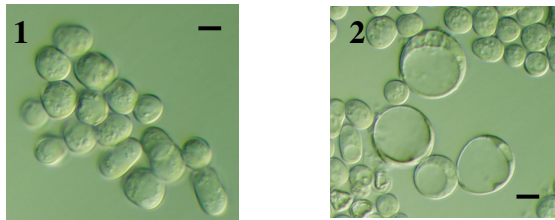
Ezeket a 7-163-as mutánsra jellemző vakuólumokat egyaránt megtaláljuk az egyedi sejtekben és a mikrohifákban is. A 7-80-as és a 7-163-as törzskönyvi számú törzsek keresztezéséből több teljes oktád született. A nyolc spórából felnövekedett nyolc telepből mintákat készítettünk és megvizsgáltuk a vakuólum-morfológia öröklődését (38. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a *myc<sup>-</sup>* fenotípus és a vakuoláris mintázat együtt öröklődik.



**38. ábra** A nyolc aszkospórából felnövekvő telepekből készített minták vakuolumai (a sejteket MDY-64-gyel kezeltük). Méretvonal: 3 µm

### 5.5.4.1.2. Kerek sejtek

$Myc^-$  mutánsaink tenyészetében szilárd táptalajon, az inkubálás 6-10 napja után, a vad típustól eltérő képet látunk: a megnyúlt sejtek és kialakulóban lévő hifák helyett lekerekedett, rövid élesztősejteket találunk. Néhány mutáns esetében (7-148, 7-154, 7-155, 7-176) az exponenciálisan növekvő tenyészetekben is ezeket a jellegzetesen kerek sejteket figyelhetjük meg (39. ábra).



**39. ábra** Rövid és kerek sejtek a 7-148-as mutáns (1) 24 órás, YEL-ben nevelt tenyészetében. (2) Vakuóllummal kitöltött sejtek a stacioner fázisban lévő tenyészetben. Méretvonal: 5  $\mu\text{m}$

A 7-176-os mutáns esetében a kísérletek során megfigyeltük, hogy a kerek élesztősejtek szőlőfürtöz hasonlóan együtt maradnak. A sejtek nem minden esetben válnak el egymástól, esetenként sep-szerű növekedési mintát láthatunk (40. ábra).



**40. ábra** Egymáshoz tapadó sejtcsoport a 7-176-os mutáns 24 órás, YEL-ben nevelt tenyészetében. Méretvonal: 3  $\mu\text{m}$

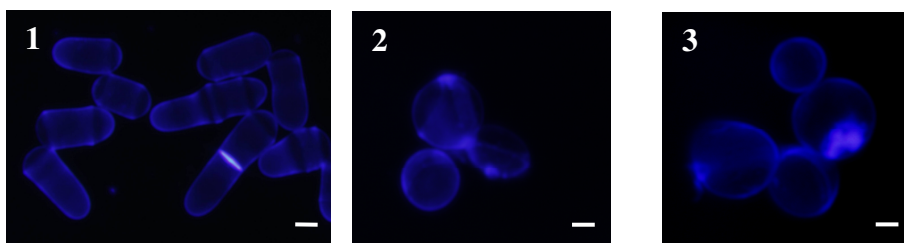
Kerek mutánsaink, eltérően a vad típusú törzs élesztősejtjeitől, izotróp növekedésűek. Hogy bizonyítsuk e feltevésünket, fixált sejtek F-aktin festését végeztük el.

A sejtekben az aktin foltok random eloszlást mutattak, szemben a bipolárisan növekvő, hosszúkás alakú, vad típusú sejtekben tapasztalt szabályos, a sejtek két végére összpontosuló aktin eloszlással (41. ábra).



**41. ábra** Az aktin eloszlásának összehasonlítása a vad és mutáns sejtekben. (1) 7-1 vad típusú törzs (2) 7-155 mutáns. Méretvonalak: 3  $\mu$ m.

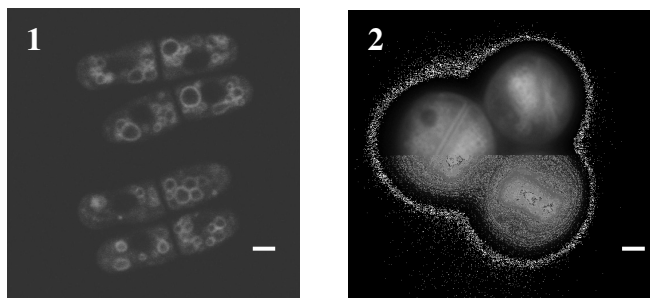
A sejt polaritás elvesztése nemcsak az aktin eloszlásban mutatkozott meg. Kalkofluorral festve a sejteket láthatóvá váltak a szeptumok és az osztódásból visszamaradt osztódási heg nyomai (42. ábra). A vad típusú sejtek esetében a kialakuló szeptum mindig a hosszanti tengelyre merőlegesen, a sejt központi vonalában jön létre. A kerek sejtben az előző szeptummal különböző szöget bezárva, ritkán merőlegesen jönnek létre az újabb szeptumok. A mutánsok esetében többször figyeltünk fel arra, hogy a kalkofluorral történő festést követően a sejt felszínén lerakódott szeptum anyag foltjai láthatóak.



**42. ábra** Kalkofluor festés. (1) A vad típusú törzs exponenciális tenyészetének sejtjei. (2) és (3) A 7-155 mutáns exponenciális tenyészetének sejtjei. (2) A mutáns sejtek szeptumai nem helyeződnek merőlegesen a

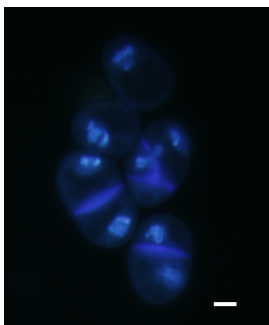
növekedés síkjára és (3) a sejtek felszínére a szeptum anyag foltosan rakódik le. Méretvonalak: (1) 5  $\mu\text{m}$ , (2, 3) 2  $\mu\text{m}$

A vakuólumok jelentős szerepet játszanak az élesztő-micélium átalakulás során (mint a 3.2.6.1 fejezetben kifejtettük). A megnyúlt sejtek vakuólumai fúzionálnak, majd a növekvő hifa egyik végében poláris sejtalkotóként fontos szerepet töltenek be a bipoláris-monopoláris növekedés kialakulásában és az energiakímélő hifa növekedésben. Kerek mutánsaink esetében kisméretű vakuólumok töltik ki a sejteket (43. ábra).



**43. ábra** A 7-154-es mutáns exponenciális tenyészetében a vakuólumra festett sejtek nagy számú, apró vakuólummal rendelkeznek (az alkalmazott festék az MDY-64). Méretvonalak: (1) 5  $\mu\text{m}$ , (2) 3  $\mu\text{m}$

Kerek mutánsaink esetében az osztódások nem minden esetben járnak azonos méretű utódsejtek képzésével. A szeptum és sejtmag festéssel azt tudtuk nyomon követni, hogy minden utódsejt rendelkezik-e sejtaggal (44. ábra).



**44. ábra** A 7-154 mutáns exponenciális tenyészetének sejtjei kalkofluor és DAPI festést követően. Méretvonal: 2  $\mu\text{m}$

#### 5.5.4.2. Spórázás képességének tesztelése

Micélium-képzésben sérült, *myc*<sup>-</sup> törzseink spórázási képességét spóráztató táptalajon (EMMA-N) vizsgáltuk (Anyagok és módszerek 4.3.1.2. fejezet). A kontrollként használt 7-1-es törzskönyvi számú, vad típusú törzs tenyészetében 24 óra elteltével már konjugáló sejteket, nagyszámú zigótikus aszkuszt és szabad spórákat figyeltünk meg. Tenyészetében esetenként találtunk olyan aszkuszokat is, melyek két egymástól el nem szeparálódott leánysejt egyikének és egy másik ezektől független sejt konjugációjának eredményeként alakultak ki. A későbbiekben a másik leánysejt is konjugálhatott egy arra alkalmas sejttel, így létrejöhetett egy egymástól a szeptum révén elválasztott dupla aszkusz (45. ábra).

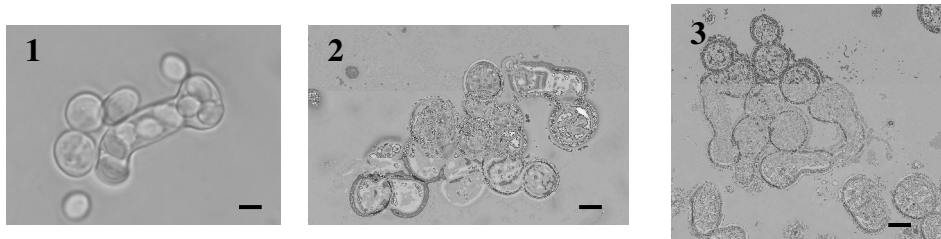


**45. ábra** Aszkuszok a *S. japonicus* 7-1 vad típusú törzsének tenyészetében. Spóráztató táptalajon, 24 óra elteltével (1) 8 spóras zigótikus aszkuszokat és (2) szeptummal elválasztott dupla aszkuszokat találtunk. A szeptumot nyíllal jelöltük. Méretvonalak: 5  $\mu$ m

Mutánsainkat vizsgálva korántsem láthattunk a vad típusnál megfigyelt 70-80%-os spórázási arányt. A 7-154, 7-155 és 7-176-os mutánsoknál nincs konjugáció, nincs aszkusz- és spóráképzés. Ezek tehát sterilek.

A 7-63, 7-96, 7-148, 7-157, 7-159, 7-163 mutáns törzsek esetében kis számban megfigyeltünk konjugáló sejteket (46. ábra). Gyakran láttuk, hogy a konjugáció folyamata a sejtvégék megnyúlásával elindult, de kevesebb volt az olyan eset, amikor a két sejt fuzionált is. Az aszkuszképzés 24 óra elteltével még nem, vagy elvétve volt megfigyelhető. Ezekben a

tenyészetekben újabb 24 órás inkubáció után már láttunk aszkuszt, keveset ugyan, de ez arra utalhatott, hogy az egyébként igen ritkán bekövetkező konjugáció esetenként befejeződött. Létrejött a diploid zigóta, majd a meiózis is lejátszódott (amit mitózis követett), aminek eredményeképpen kialakult az aszkusz, benne a 1-8 db askospórával. A 7-156-os mutáns tenyészetét kivételt képezett, mert bár itt sem találtunk a vaddal megegyező mértékű spórázást, 40-60%-os spórázási arányt figyeltünk meg.



**46. ábra** Steril és gyengén spórázó  $myc^-$  mutánsok. (1) 7-1-es kontrol, (2) 7-176-os és (3) 7-96-os törzskönyvi számú mutáns törzsek. Méretvonal: 5  $\mu\text{m}$

Meg kell jegyeznünk, hogy a kísérleteket természetesen elvégeztük a szülői, auxotróf törzsekkel is. A 7-26, 7-31, 7-70, 7-81 auxotróf törzsek a vaddal megegyező spóráképzést mutattak.

A spórázás vizsgálata során több mutánsnál tapasztaltuk, hogy a N-szegény táptalajon inkubált tenyészetben nagymértékű a sejtek pusztulása. 24 óra után 30%-os pusztulást láttunk a 7-176-os, 50-50%-ost a 7-155-ös és a 7-154-es és 70%-ost a 7-157-es és törzskönyvi számú törzsek esetében. További mutáns törzseink tenyészetében is láthattuk, hogy a sejtek érzékenyek a nitrogén mennyiségének csökkentésére, több elpusztult sejtet találtunk a mikroszkópos felvételeken.

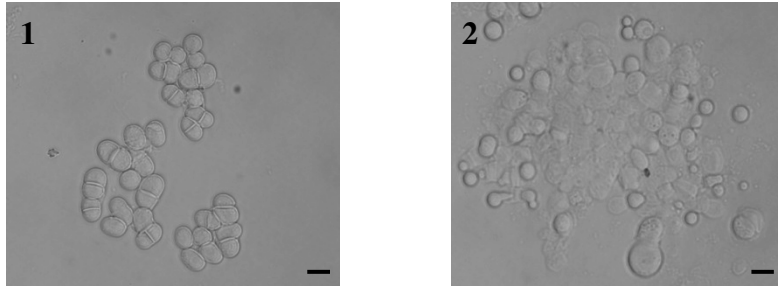
#### 5.5.4.3. Sejtfal szerkezet integritása

A *S. pombe* vagy a *C. albicans* esetében a sejtfal szerkezetében és kémiai összetételében bekövetkező változások több tulajdonság, például a sejtalk megváltozásához vezettek (pl: Ribas és tsi, 1991; Willer és tsi, 2005, Herrero és tsi, 2004, Umeyama és tsi, 2006). Annak érdekében, hogy megtudjuk, vajon hasonló változások állnak-e a *S. japonicus* mutánsok morfológiai jellegzetességei mögött is, hipoozmotikus körülmények között (vízben) teszteltük a mutáns törzseink  $\beta$ -glükánáz érzékenységét (Melléklet 4. táblázat). A törzseket sejtalk alapján három csoportba soroltuk.

Több mint két órás inkubálás után is jelentős eltérések tapasztalhatóak a vad és mutáns törzseink között: a mutáns sejtek 60-100 százaléka, míg a 7-1-es törzs sejteinek csak 40 százaléka pusztult el. Kísérleteink szerint a 7-176 mutáns sejtjei bizonyultak a legérzékenyebbeknek: a sejtek 70%-a elpusztult már 50 perces enzimes kezelés után, holott a vad típusú sejtek lízise csak ekkor indult meg.

A 7-176-os mutáns kimagasló  $\beta$ -glükánáz érzékenységét egy másik megfigyelés is alátámasztotta. A mutánsok keresztezésekor elvégzett protoplaszt fúzióknál felfigyeltünk arra, hogy a lysing enzimes kezelést követően a 7-176-os mutáns tenyészetében a protoplasztok megjelenése sokkal korábban volt tehető, mint a többi mutáns és a vad típusú törzs tenyészeiben. A protoplaszt fúzió során a sejteket 3.5 mg/ml koncentrációjú lysing enzimet tartalmazó kálium-klorid oldatban inkubáljuk a protoplasztok kialakulásáig, amely kb. 60-120 percet vett igénybe. A 7-176-os mutánsunk sejtjei már 16 perc elteltével az 47. ábrán látható protoplasztokká alakultak.





**47. ábra** A 7-176-os mutáns sejtjei (1) lysing enzimes kezelés előtt és (2) 16 perccel a kezelés és inkubálás után. Méretvonalak: 10  $\mu\text{m}$

#### **5.5.4.4. Mutáns törzseink ozmotikus és hőmérséklet-érzékenysége**

A *S. pombe* számos morfológiai mutánsánál, például a sep, vagy az sph (spherical, kerek) mutánsoknál, a vad típustól eltérő kálium-klorid, kalcium-klorid, nátrium-klorid, magnézium-klorid, valamint szorbit és hőmérséklet érzékenységet találtak (pl.: Sipiczki és tsi, 1993, Grallert és tsi, 1999, Sipiczki és tsi, 2000b, Miklos és tsi, 2008). Kézenfekvő volt tehát, hogy megvizsgáljuk sep-szerű mutánsaink toleranciáját a felsorolt anyagokra (Melléklet 5-10. táblázatok). A vizsgálatokat kerek mutánsainkra is kiterjesztettük, mivel kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a sejtalak milyen tűrőképességgel párosul.

Jelentős **kálium-klorid** érzékenységet a vizsgált koncentrációk esetén nem tudunk kimutatni (Melléklet 5. táblázat). A 7-159-es mutáns érzékenysége tűnik a legnagyobbaknak. A kísérlet egyik érdekes eredménye az volt, hogy a vad típusú törzs esetében a micélium-képzés képessége a növekvő kálium-klorid koncentrációval párhuzamosan fokozatosan redukálódott: 0,9 M-os koncentrációnál szűnt meg a micélium-képzés.

Jelentős **nátrium-klorid** érzékenységet három mutánsunk mutatott: 7-159, 7-176, 7-154 (Melléklet 6. táblázat). Egyikük sem növekedett 0,6M-os NaCl koncentráció mellett. A 7-159-es törzskönyvi számú sep-szerű mutáns

pedig hiperérzékenynek bizonyult, mert már a 0,3M-os koncentráció is megakadályozta a növekedését. A 7-63, 7-155 és a 7-163 kisebb mértékben ugyan, de szintén kevésbé növekedett az emelkedő NaCl koncentrációt tartalmazó táptalajokon. A 7-148-as törzskönyvi számú mutáns törzsnél inkább rezisztenciát figyeltünk meg, nagyobb koncentráció esetén is szép növekedést mutatott, szebbet, mint a vad típus. Kontrol törzsünk nem növesztett micéliumot a legkisebb vizsgált só mennyiség mellett sem.

A **kalcium-klorid** érzékenység mind a kerek mind a sep-szerű mutánsainknál érdekesen alakult (Melléklet 7. táblázat). A 0,6 M-os koncentráció minden vizsgált törzs esetében túl magasnak bizonyult a növekedéshez. sep-szerű mutánsaink közül a 7-159-es, 7-163-as és a 7-176-os törzskönyvi számú mutánsoknál láttunk jelentős érzékenységet. A 7-159 és 7-176-os mutánsok nem növekedtek 0,2 M-os koncentrációnál. Kisebb érzékenységet mutattak a 7-63-as, 7-148-as és a 7-154-es törzskönyvi számú mutánsok. A vad típusú törzs esetében, bár a növekedés megegyezik a kontrol csészén látottakkal, micélium-képzést nem találtunk már a 0,1 M esetén sem.

A 7-159-es törzskönyvi számú mutáns esetében jelentős **magnézium-klorid** érzékenységről beszélhetünk, hiszen már 0,3 M-os koncentrációnál sem tapasztaltunk növekedést. A micélium-képzést ez a só nem befolyásolta, még az alkalmazott legnagyobb koncentráció mellett is tapasztaltunk „h+” növekedést a vad típusú törzsünknel (Melléklet 8. táblázat).

A mutánsok ozmotikus érzékenységét növekvő koncentrációjú **szorbit** mellet is vizsgáltuk (Melléklet 9. táblázat). Hasonlóan a kálium-klorid teszthez, itt sem tudtunk kiemelkedő érzékenységet dokumentálni. A kerek és sep-szerű mutánsaink kismértékben, de érzékenyebbnak bizonyultak a kontrol törzshöz képest. Ha a vad típusú törzs micélium-képzését

vizsgáljuk, láthatjuk, hogy 1,8M-os koncentrációnál már nem fejlesztett micéliumot.

A 7-63, 7-148, 7-154, 7-155, 7-157, 7-159 mutánsok 37°C-on kevésbé nőttek, mint a vad (Melléklet 10. táblázat). Szintén 37°C-on a 7-156, 7-163, 7-176-os mutánsok mutattak jelentős, a vad típustól és a 30°C-on tapasztalttól eltérő hőmérséklet érzékenységet. A 25°C-os inkubálás hatása abban tükröződött, hogy a mutánsaink növekedése lassabban indult meg, mint 30°C-on, ugyanakkor 11 nap elteltével a növekedés mértéke általában megegyezett a vad típuséval.

## **5.6. Proteomikai vizsgálatok élesztő és micéliális fázisban lévő tenyészeteken**

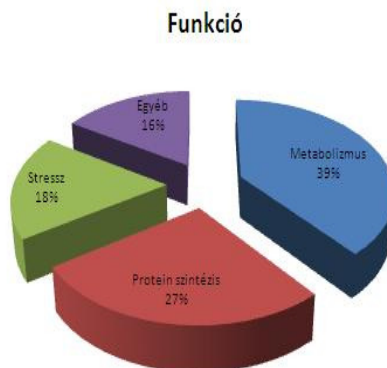
A folyadék kromatográfiával kombinált MS/MS, dupla tömegspektrometriai, méréseket az ezredforduló után kezdték használni a proteomikai kutatásokban (pl. Peng és tsi, 2003). Ezt a módszert számos céllal használják: komplex minták elemzésére, poszttranszlációs módosítások kimutatására, protein komplexek összetételének meghatározására. A *S. pombe* esetében több cikkben is beszámoltak a sejtes mintákból azonosított fehérjékről (Sun és tsi, 2005, Hwang és tsi, 2006, Schmidt és tsi, 2007). Schmidt 2007-ben megjelent cikkében 1465 fehérje azonosításáról számol be, ami a *S. pombe* proteomjának 30%-át reprezentálja.

A vizsgálatokkal a célunk azoknak a fehérjéknek a beazonosítása volt, amelyek specifikusan (nagy mennyiségben) expresszálódnak vagy represszálódnak az élesztő-micélium átalakulást követően. Kísérleteinket a két vizsgált hasadó élesztő közül a *S. pombe* L975-ös törzskönyvi számú törzsével végeztük, mert a kísérlet elvégzésekor csak a *S. pombe* esetében állt rendelkezésre olyan adatbázis, amelynek segítségével a fehérjék azonosíthatóak voltak (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/yeast/pombe/>). Az LC-

MS/MS tömegspektrometria eredményeképp kapott adatok alapján az élesztős mintából 138, a micéliális mintából 85 fehérje peptidjével talált egyezést a program (Melléklet 11. táblázat). Természetesen voltak olyan fehérjék, amelyek mindkét mintában egyaránt előfordultak, így összesen 149 különböző fehérjét azonosítottunk. A 149 fehérje azonosítása során olyan szűrőrendszert alkalmaztunk, amely minimálisra csökkenti a hibás találatok lehetőségét (lásd: Anyagok és módszerek 4.3.2.9. fejezet). Feltételezhető, hogy a szűrés után olyan fehérjéket mutattunk ki a két tenyészetben, amelyek amellet, hogy a megadott kritériumoknak megfeleltek, még nagy mennyiségben is termelődtek az élesztő és a hifasejtekben. Hiszen minél több adat áll rendelkezésre, minél többször vizsgálható ugyanaz a fehérje (azaz nagy mennyiségben van jelen), annál biztosabban azonosítható.

A kapott fehérjéket funkció szerint négy nagy csoportba sorolhatjuk (48. ábra):

1. *metabolizmus*: 39%
2. *stressz válasz*: 18%
3. *protein szintézis*: 27%
4. *egyéb*: 16%



**48. ábra** Funkció szerinti százalékos eloszlás a 149 azonosított fehérje között

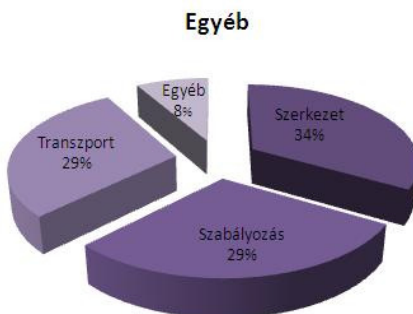
A legnépesebb csoportba, a metabolikus fehérjék közé soroltuk a szénhidrát, aminosav és nukleotid metabolizmusban részt vevő fehérjéket. Ebben a csoportban a legtöbb enzimet a glikolitikus enzimek között azonosítottuk. Ezek például az enoláz, a foszfoglicerát kináz, a fruktóz biszfoszfát aldoláz, az alkohol dehidrogenáz és a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH).

A stressz válaszban résztvevő fehérjék között mindkét mintában megtalálhatjuk a hősokk fehérjék több típusát: Hsp60p, Hsp70p, Hsp90p. Találtunk a translációban résztvevő riboszómális fehérjéket: 60S és 40S alegységeket és translációs elongációs faktorokat (transzlációs elongációs faktor 1, 2, 3).

A mitokondriális fehérjék között azonosítottuk például az energiatermelésben résztvevő ATP szintézishez szükséges *atp1*, *atp2*, *atp4* génekről átíródó fehérjéket és a mitokondriális légzési lánc citokróm c-jét, vagy a citokróm c oxidázt.

Az „Egyéb” csoportot is tovább rendszereztük: a szabályozásban, a sejt-és kromoszómaszerkezet fenntartásában, valamint a transzportban szerepet játszó fehérjéket találtunk (49. ábra).

1. *szerkezet*: 34%
2. *szabályozás*: 29%
3. *transzport*: 29%
4. *egyéb*: 8%



**49. ábra** Az „Egyéb” csoportba tartozó fehérjék további osztályozása

Ha nemcsak az összesített listánkat, hanem a két tenyészet önálló eredményeit funkció szerint vizsgáljuk, az alábbi eloszlásokat kapjuk (10. táblázat). A táblázatban kiemeltük azokat az alcsoportokat, amelyek a kategóriákon belül a legnagyobb arányban képviseltették magukat.

**10. táblázat** Funkció szerinti eloszlás az élesztő, micéliális mintánkban és együttesen (\* zárójelben az alkategóriák fehérjéinek százalékos előfordulása az összes azonosított fehérjéhez képest)

Funkció	összesen (149)	élesztő (138)	hifa (85)
	Százalékos előfordulás (%)		
<b>metabolizmus</b>	38,9	36,9	50,6
glikolízis/glükoneogenezis	29,3 (11,4)*	33,3 (12,3)	30,2 (15,3)
<b>stresszválasz</b>	18,1	18,8	24,7
hősokk	33,3 (6,1)	34,6 (6,5)	33,3 (8,2)
<b>fehérje szintézis</b>	26,8	28,9	11,8
riboszómális protein	82,5 (22,1)	82,5 (23,9)	40,0 (4,7)
<b>egyéb</b>	16,1	15,2	15,3

Mindkét mintában a metabolikus proteinek dominálnak. A glikolitikus enzimek mindkét csoportban nagyon hasonló arányban vannak jelen. A transzlációban részt vevő fehérjék találhatóak az élesztőkben a második helyen. Ezzel szemben a micéliális mintából ebben a csoportban sokkal kevesebb, csak 40 %-os volt a riboszómális fehérjék aránya, azaz jóval kevesebbet mutattunk ki, mint az élesztőkből. Ezért ez a csoport a negyedik pozícióba került. Mindkét mintában a jelentősnek bizonyultak a stressz válaszban szerepet játszó fehérjék, közöttük majdnem azonos arányban találtuk meg a hősokk fehérjéket. E mellett ozmotikus és oxidatív stressz fehérjéket azonosítottunk.

A két mintát összehasonlítva azokat a fehérjéket soroltuk fel a Melléklet 12. táblázatában, amelyeket adataink alapján a micéliumokból igen, de az élesztőkből nem mutattunk ki. Ezek az alfa-glükozidáz, NAD-függő malát enzim, nukleáris telomer sapka komplex alegysége, citrát szintetáz, replikációs regulátor, konzervatív gomba fehérje, ADP-ribosziláló faktor,

ubikinol citokróm c redukáz komplex központi fehérje, citokróm c oxidáz alegység V, citokróm c, piridoxál-redukáz. Az itt látható fehérjék között találunk extracelluláris, mitokondriális fehérjéket, a sejtmagban, a Golgi-apparátusban, a citoszolban elhelyezkedőket. Szerepük az aminosav, oligoszacharid, vitamin metabolizmustól indulva az apoptózisig és az elektron transzportig szintén nagyon változó.

### **5.7. Kiegészítő eredmények: módszerfejlesztések**

Az izolált *S. japonicus* mutánsok, ezáltal a dimorf átalakulás mechanizmusának jobb tanulmányozhatósága érdekében nélkülözhetetlen módszertani fejlesztésre és további információszerzésre volt szükség. Ezért kísérleteket kezdtünk (a dimorfizmus vizsgálatával párhuzamosan) a *S. japonicus* konzervatív génjének izolálására, kromoszómáinak elkülönítésére és kromoszómaszámának meghatározására annak érdekében, hogy a kapott információt felhasználjuk például a dimorfizmus hátterében álló gének térképezésére. Az elvégzett kísérletek egy hosszú távú módszerfejlesztés részeredményei. A dolgozat egységessége miatt eltekintünk a részletes kifejtésüktől. Ugyanakkor ismertetésüket fontosnak tartjuk, mert ezek a kísérletek és eredmények esszenciálisak ahhoz, hogy a *S. japonicus*-ról, így a dimorfizmusról is többet tudjunk meg. Az Eredmények utolsó fejezetében ezeket a tapasztalatainkat mutatjuk be röviden, összefoglalás jelleggel.

#### **5.7.1. *S. japonicus* aktint kódoló génjének izolálása, kromoszómáinak elkülönítése és kromoszómaszámának meghatározása**

A *S. japonicus* genomjáról a 2006 őszén megkezdett genomszekvenálási projekt elindulásáig igen kevés információ állt rendelkezésünkre, ám annál többet tudtunk a közeli rokon *S. pombe* és a sarjadzó élesztő *S. cerevisiae* génjeiről és fehérjeiről (pl: Gallwitz és Seidel, 1980, Lees-Miller és tsi,

1992). E tudásunkat felhasználva az aktin fehérjét kódoló génre tervezett primerek segítségével, PCR módszerrel amplifikáltuk a *S. japonicus* aktin génjének 716 bp méretű szekvenciáját. A tervezésénél a *S. pombe* és *S. cerevisiae* aktin fehérjéjének aminosav és génjének nukleotid szekvenciáit a Jellyfish 3.1 szoftver segítségével illesztettük. Az aktin fehérje a konzervatív fehérjék közé tartozik. Az illesztés során tehát számos lehetőség adódott a konzervatív, nagymértékben azonos fehérjeszekvenciák kiválasztására. A kiválasztott aminosavakat kódoló kodonokra degenerált primereket terveztünk és az Anyagok és módszerek 4.3.2.1. fejezetében bemutatott PCR programmal kaptuk meg azt a fragmentet, amely a szekvenálás és szekvencianalízis eredményei szerint a *S. japonicus* aktin génjének 716 bp méretű darabja. A kapott szekvenciát DQ867021 azonosítóval, 2006 júliusában elhelyeztük az NCBI GenBank-jában.

A szekvenálási során hasonló géneket és fehérjéket kerestünk nukleotid és fehérje adatbázisokkal összevetve a kapott nukleotid-szekvenciánkat (BLASTn) és annak a program által elkészített aminosav átiratát (BLASTx). A BLASTn adatai szerint a fenti szekvenciával hasonlóságot mutató gének mind aktin fehérjéket kódolnak. A BLASTn a legmagasabb nukleotid szintű megegyezést egy zygomycoota gomba, a *Mortierella minutissima* részleges aktin szekvenciájával mutatta (86%: 621/716), ezzel szemben a BLASTx a legmagasabb, 94%-os (219/232) azonosságot a *S. pombe act1* génjével találta. A kapott nukleotid-szekvencia a BLAST2 illesztése alapján 84%-os (595/708) megegyezést mutat a *S. pombe act1* génjével. Ez utóbbi illesztés után megállapítottuk, hogy a 716 bp szekvencia 7-712 bázispárig tartó szakasza a *S. pombe* aktin filament génjének (*act1*: 1128 nukleotid) 293-tól a 999. nukleotidig tartó részletével mutat megegyezést.

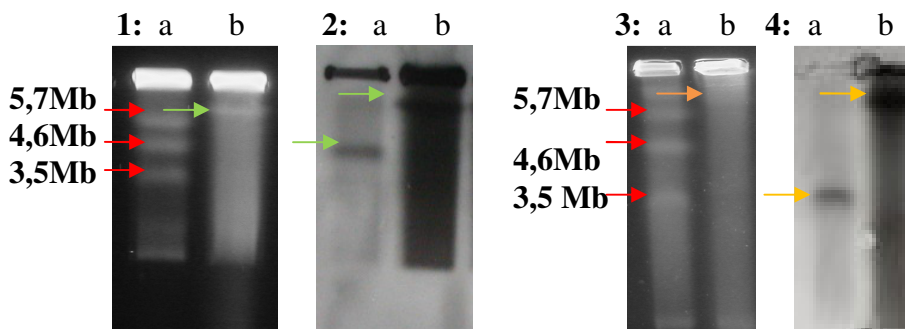


Ma már (2007-től) a *S. japonicus* teljes aktin génjének szekvenciája ismert (*Schizosaccharomyces* group database: [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/MultiHome.html)). A gén 1128 nukleotidból épül fel, mely 375 aminosavat kódol (azonosító: SJAG 03145). A kapott 716 bp szekvenciánk nukleotid sorrendje 99%-ban egyezik meg a gént átfedő szakasszal, ez az 1%-os eltérés a szekvenálás pontatlanságának tudható be. A teljes aktin gén *S. pombe act1* génjével történő illesztése 84%-os (957/1128) megegyezést mutat, hasonlóan ahhoz amit találtunk az általunk kapott PCR termék esetében. A kódolt fehérje aminosav sorrendjét illetően magasabb értéket kaptunk. Az azonosság: 97% (365/375). A három szekvencia illesztése az 50. ábrán látható.

	1	11	21	31	41	51	61	71
<b>DQ867021</b>	-----							
<b>SJAG 03145</b>	MEEET	VALVIDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFFSIVGRPRH	Q	SIMVGMGQKDSYVGDEAQS	KRGILTL	R	YPIEHGIV	TMMD
<b>SPBC32H8_12c</b>	MEEET	AALVIDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFFSIVGRPRH	H	QIMVGMGQKDSYVGDEAQS	KRGILTL	K	YPIEHGIV	TMMD
Consensus	meeei	alvidngsgmckagfagddapravfsvigrprh	q	simv	gmqkdsyvgdeaqskrgiltl	r	ypiehgiv	nwd
<b>DQ867021</b>	81	91	101	111	121	131	141	151
<b>SJAG 03145</b>	-----CSSEHFACLLFL*THKSNREKMTQIIFETFNAPAFYVSIQAVLSLYASGRITGIVLDSGDGVT							
<b>SPBC32H8_12c</b>	DMEKI	WHHTFYNELRVAP	EEHPC	LLEAF	LNPKSNREKMTQIIFETFNAPAFYVSIQAVLSLYASGRITGIVLDSGDGVT			
Consensus	dmeki	whhtfyne	lrvapeehpc	llleap	lnpksnre	kmtqiifetfnafyvs	iqavlslyasgrttg	ivldsgdgv
<b>DQ867021</b>	161	171	181	191	201	211	221	231
<b>SJAG 03145</b>	HTVPIYEGYALPHAIMRLDLACGRDLTDYLMKILMERGYTFSTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQELQTAQSSSLEKSY							
<b>SPBC32H8_12c</b>	HTVPIYEGYALPHAIMRLDLACGRDLTDYLMKILMERGYTFSTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQELQTAQSSSLEKSY							
Consensus	htvpiyegyalphaimrldlagrdltdylmkilmergytftstaereivrdikeklyvaldfeqelqtaaqssleksy							
<b>DQ867021</b>	241	251	261	271	281	291	301	311
<b>SJAG 03145</b>	ELPDGQVITIGNERFRAPEALFNPSVLGLENAGIHEATYNSIMKCDVDIRKDLYGNIVHSGGTTTHYPGIADRMQKEIQAL							
<b>SPBC32H8_12c</b>	ELPDGQVITIGNERFRAPEALFNPSVLGLENAGIHEATYNSIMKCDVDIRKDLYGNIVHSGGTTTHYPGIADRMQKEIQAL							
Consensus	elpdgqvittignerfrapealfnpsvlglenagiheatynsimkcdvdirkdlygnivhsggttthypgiadrmqkeiqal							
<b>DQ867021</b>	321	331	341	351	361	371	381	391
<b>SJAG 03145</b>	APSSMKVKIVAPPERKYSVMIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGFIVYRRCF							
<b>SPBC32H8_12c</b>	APSSMKVKIVAPPERKYSVMIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGFIVYRRCF							
Consensus	apssmkvkivapperkysvmiggsilaslstfqqmwiskqeydesgp							ivyrkcf

**50. ábra** A *S. japonicus* aktin fehérjéjének részleges (DQ867021) és teljes (azonosító: SJAG 03145) szekvenciáját illesztettük a *S. pombe* aktin fehérjéjének aminosav szekvenciájával (SPBC32H8\_12c)

A *S. japonicus* genomjából PCR segítségével amplifikált és digoxigenin (DIG) jelölt részleges aktin szekvenciát (DQ867021) a CHEF DRIII rendszerben futtatott és elválasztott kromoszómákhoz hibridizáltuk. A gél elektroforézis során a *S. japonicus* 7-1-es törzsének tenyészetéből, kontrollként pedig a *S. pombe* L972 törzsének tenyészetéből készítettük a mintáinkat. Amíg a *S. pombe* három kromoszómája által jelölt sávok mindig jól láthatóak voltak a gélen az elektroforézis után, addig a *S. japonicus*-nál az elektrokariogramokon csak egyetlen élesen kirajzolódó vonalat láttunk (51/1. ábra). A *S. pombe* aktin génje és a DQ867021 szekvencia közötti 84%-os nukleotid szintű azonosság a magyarázata annak, hogy a *S. pombe* második kromoszómája az 51/2. ábrán láthatóan pozitív jelet adott. A *S. japonicus* esetében a kariogramon látható egyetlen sáv jelölődött a hibridizáció után (51/2. ábra).



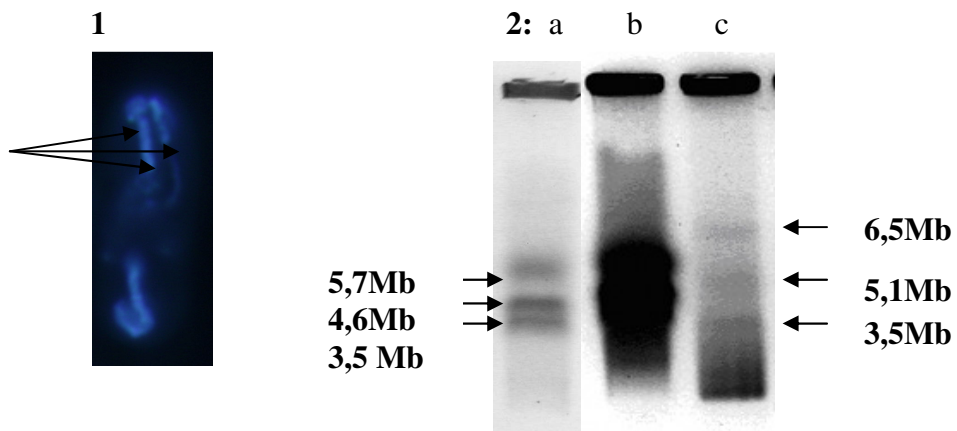
**51. ábra** A *S. japonicus* DIG-jelölt részleges aktin és ITS1-5,8S rDNS-ITS2 szekvenciájának hibridizálása a kariotípusokhoz. (1, 3) Pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogram. „a” minta: *S. pombe*, „b” minta: *S. japonicus* (Futtatási paraméterek 1. (51/1,2. ábra) és 2. típus (51/3,4. ábra), lásd: Anyagok és módszerek 4.3.2.2. fejezet). (2, 4) A minták sorrendje: „a”: *S. pombe* L972, „b”: *S. japonicus* 7-1. A piros nyilak mellett a *S. pombe* kromoszómáinak méreteit tüntettük fel (Smith és tsi, 1987). A próba a *S. pombe* 2. kromoszómájának és a *S. japonicus* egyetlen kromoszómájának sávjával adott pozitív jelet (zöld nyilakkal jelölve). A

próba a *S. pombe* 3. kromoszómájának és a *S. japonicus* egyetlen kromoszómájának sávjával adott pozitív jelet (sárga nyilakkal jelölve).

A *S. japonicus* PCR segítségével felszaporított ITS1-5,8S rDNS-ITS2 régióját is jelöltük random primer DIG jelölő technikával. Az így kapott próba az 51/3-4. ábrán látható helyen, a *S. pombe* legkisebb kromoszómájának megfelelő sávval adott pozitív jelet, míg a *S. japonicus* esetében ismét egyetlen sáv jelölődött.

A *S. japonicus* kromoszómaszámának meghatározására a klasszikus módszert, a fluoreszcens festést használtuk. DAPI segítségével tettük a kromoszómákat láthatóvá. A fluoreszcens festés során 3 db kromoszóma rajzolódott ki a *S. japonicus* osztódó sejtjeiben (52/1. ábra).

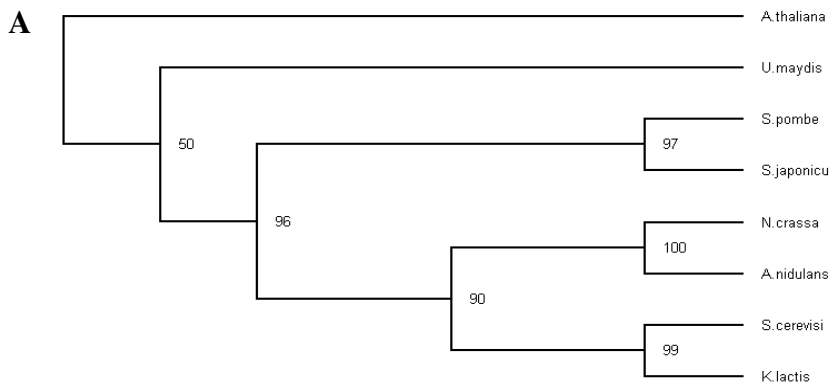
Az 51. ábrán bemutatott kariogramokon azonban több futtatási paraméter kipróbálása után is csak egyetlen sávot láttunk az etídium-bromidos festés után. Az 52/2. ábrán bemutatott elektrokariogramon azonban kirajzolódik a *S. japonicus* három kromoszómája által adott három sáv is.

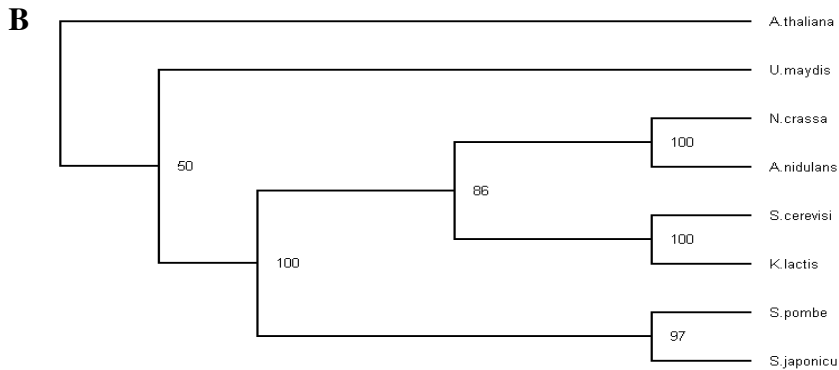


**52. ábra** Kromoszómaszám meghatározás (1) Fluoreszcens technikával, DAPI festéssel: a nyilak a 3 feltételezett kromoszómára mutatnak (2) Pulzáló erőterű gélelektroforézissel készített elektrokariogram. „a” és „b” minta: *S. pombe* L972, „c”. minta: *S. japonicus* 7-1 (Futtatási paraméterek 3. típus,

lásd: Anyagok és módszerek fejezet). A *S. pombe* kromoszómáinak láthatóvá tételére az eredeti felvételen látható sávok (b) kontrasztját csökkentettük (a). A nyilak mellett a *S. pombe* kromoszómáinak méreteit (Smith és tsi, 1987) és a *S. japonicus* kromoszómáinak feltételezett méreteit tüntettük fel.

A sejtek működésében betöltött alapvető szerepe révén az aktin az eukarióta organizmusok egyik legkonzervatívabb fehérjéje. A gerincesek, gerinctelenek, gombák, növények és protozoák aktin fehérjéje 70-90%-os azonosságot mutatott, 374-376 aminosavból épül fel (Gallwitz és Seidel, 1980, Lees-Miller és tsi, 1992). E tulajdonsága révén a különböző fajok aktin fehérjéinek analízise alapján törzsfá készíthető, amely az általuk elfoglalt filogenetikai pozíciókra utal. A teljes gén által kódolt fehérjét figyelembe véve elkészítettünk két törzsfát (53. ábra).





**53. ábra A:** Maximális valószínűség (Maximum likelihood) **B:** Neighbor-Join algoritmusok; Hemiascomycetes: *Sa. cerevisiae* NP\_116614, *K. lactis* XP\_453299; Euascomycetes: *N. crassa* XP\_323513, *A. nidulans* P20359; Archiascomycetes: *S. pombe* NP\_595618, *S. japonicus* XP\_002174311; Külső csoport: Basidiomycota: *U. maydis* XP\_762364 és az *A. thaliana* NP\_187818;

Homológ aktin fehérjék alapján felállított törzsfánk egybevág azzal a hipotézissel, mely szerint a *S. pombe* és a *S. japonicus* által képviselt Archiascomycota taxon korábban elvált a Hemi- és Euascomycetes-ektől (Fitzpatrick és tsi, 2006, Kuramae és tsi, 2006). Fitzpatrick 2006-os cikkében a szuperfa analízishez használt 153 fehérje között szerepelt az aktin is. A *S. pombe* filogenetikai pozíciója az általa elvégzett maximális valószínűség módszer alapján megegyezik a mi eredményeinkkel.

## 6. Eredmények megbeszélése

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, Gale és tsi, 1998, Jackson és tsi, 2007). A dimorfizmus kutatásához előnyös olyan fajokat választani, amelyek nem patogének, azaz nem rendelkeznek megbetegítő képességgel, de rendelkeznek az átváltás tulajdonságával. A hasadó élesztők (*Schizosaccharomyces* fajok) kiváló, nem patogén modellszervezetek. Lindner 19. századi leírásában ugyan olvashatunk az ismert hasadó élesztőgomba, a *S. pombe* fonalas alakjának kialakulásáról is (Lindner, 1893 [www-rcf.usc.edu/~forsburg/history/lindner2.html](http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/history/lindner2.html)), de ez a fenotípus természetes körülmények között azonban olyan ritkán fordul elő, hogy a kutatók nem is figyeltek fel rá. A jóval később leírt másik hasadó élesztő fajnál, a *S. japonicus*-nál már régóta ismert a jelenség, mert annyira fontos része életciklusának: valódi micélium-képzéséről már az elsőként elvégzett kísérletek ismertetésekor beszámoltak (van der Valt és Yarrow, 1984, Sipiczki, 1998a, 1998b). Ez volt az a tulajdonság, amely kiemelte a genuszból és elindította azt a kutatás sorozatot, amelyben megalapozták a faj modellszervezetként való felhasználását a dimorfizmus jellemzésére (Sipiczki és tsi 1998a, 1998b, Bozsik és tsi 2002, Furuya és Niki, 2009). 2005-ben jelent meg az a publikáció, amely beszámolt arról, hogy nitrogén szegény környezetben, magas glükóz koncentrációjú, szilárd táptalajon a *S. pombe* is képes az invazív, fonalas növekedésre (Amoah-Buahin és tsi, 2005). Újabb kísérletekben bizonyították, hogy nemcsak limitált nitrogén mennyiség

mellett, hanem komplett táptalajon is megfigyelhető a micélium-képzés, bár hosszabb időt vesz igénybe a kialakulása (Dodgson és tsi, 2009).

## **6.1. Micélium-képzés összehasonlítása a két *Schizosaccharomyces* fajnál**

Ebben a dolgozatban a két *Schizosaccharomyces* faj micélium-képzését első alkalommal hasonlíthattuk össze úgy, hogy a *S. japonicus* vad típusú törzsét kontrollként használtuk a *S. pombe* újonnan megfigyelt micélium-képzésének vizsgálatához. Az összehasonlítás során több azonos és eltérő jellegre lettünk figyelmesek.

### **6.1.1. A micélium-képzés gyorsasága**

Irodalmi adatokból feltételezhattük, hogy a két vizsgált faj közül, az élesztő-micélium átalakulás a *S. japonicus* esetében gyorsabban lejátsszódik: a valódi micéliumok kialakulása komplett táptalajon 8-10 napot vesz igénybe (Sipiczki és tsi, 1998a). Ezzel szemben a *S. pombe* invazív micéliuma speciális, aminosavaktól mentes, minimális nitrogén mennyiséget tartalmazó táptalajon (LNBA), 10-14 nap alatt, komplett táptalajon pedig legalább 14 napos inkubáció után alakul ki (Amoah-Buahin 2005, Dodgson és tsi, 2009). Az általunk használt tárgylemez csatornáiban, a *S. pombe* esetében jellemzően a micéliális növekedés kezdeti állapotát tudtuk követni az elágazásokat tartalmazó, több tagból álló pszeudohifák megjelenéséig. Ez 10-14 napot vett igénybe és a csatorna 50-100 µm hosszú kezdeti, bevezető szakaszát érintette. Ezzel a technikával, a micéliális növekedés késői szakaszában, a 14 napot meghaladó inkubáció után, 500 µm hosszú micéliumot figyelhettünk meg. Ennek eléréséhez, az élesztő-micélium átalakulás indukálásához a *S. pombe* tenyészetéhez cAMP-t adtunk (mint ahogyan arról a Bevezetés 3.2.7. fejezetében beszámoltunk, a cAMP ellentétes hatást gyakorol a két hasadó élesztőgomba micélium-képzésére). A

több hetes inkubálás során tárgylemezünkben többször ellenőriztük a tenyészetek alakulását. Néhány esetben a bemutatott képeken is láthattuk, hogy a tárgylemezek mozgatásának hatására elmozdultak a sejtek. Ezeknél a mintáknál, hosszabb inkubálás után is csak együtt maradó leánysejteket és meghosszabbodott sejteket láttunk. Úgy gondoljuk, hogy a köteges szerkezet kialakulásához nagy sejtsűrűség és a jellegzetes elrendeződés megtartása szükséges. A minta mozgatásával, a kialakult elrendeződésnek a megbontásával, a sejtsűrűség lokális változtatásával akadályozhattuk a micéliumok kialakulását.

Ugyanez a tárgylemez lehetővé tette a *S. japonicus* esetében (cAMP hozzáadása nélkül) a rendelkezésre álló teret kitöltő, többrétegű, valódi micéliumok kialakulásának alaposabb megfigyelését. 8-10 napos inkubálást követően a speciális tárgylemez 17 mm hosszú csatornáit teljesen kitöltő micélium jelent meg a *S. japonicus* minták esetében. A tárgylemez mozgatása után nem tapasztaltuk a *S. pombe*-nél említett gátló hatást.

LNBA táptalajon a *S. japonicus* esetében az élesztő-micélium átváltás gyorsabban végbemegy, mint komplett táptalajon (YEA). Ennek eredményeként az inkubálás első 5-10. napján hosszabb micélium fejlődik, mint komplett táptalajon. Az inkubálási idő növelésével (3 hét) a micélium hossza mindkét táptalajon közel azonos lesz. Ez is alátámasztja azt a korábbi megállapítást, mely szerint a *S. japonicus* dimorf átalakulását a tápanyag mennyiség (nitrogén tartalom) csökkenése váltja ki (Sipiczki és tsi, 1998a). A nitrogén-éhezés a pszeudomicélium-képzés kiváltója a *Sa. cerevisiae*-nél is (Gimeno és tsi, 1992). A patogén dimorf gombafaj, a *C. albicans* esetében a N-éhezés az egyik olyan tényező, amely elősegíti az átalakulást, azonban esetében a neutrális pH, a szérum, vagy az N-acetil-glükózamin is nagy hatékonysággal befolyásolja az átalakulást (pl. Ernst, 2000). Ez utóbbi három indukáló tényező szintén elősegíti *Y. lipolytica* fonalas alakjának kialakulását,



ugyanakkor a nitrogén mennyiség csökkenése a korábbi példákkal ellentétben, gátolja az élesztő-micélium átalakulást (pl. Szabo, 1999, Pérez-Campo és Domínguez, 2001). A *S. pombe* vad típusú törzseinek micélium-képzését is a nitrogén szegény környezet indukálta (Amoah-Buahin és tsi, 2005). Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, amely szerint a micéliumok kialakulása lassabb és az invázió kevésbé hatékonyabb komplett táptalajon, mint nitrogén szegény táptalajon (Dodgson és tsi, 2009).

### **6.1.2. Micélium-képzési stratégiák**

Meglepő, de a két *Schizosaccharomyces* faj micélium-képzési stratégiája megfigyeléseink szerint különbözik egymástól. A micéliumok szerkezete és felépítése is más jellegű: míg a *S. japonicus* valódi hifái széttartóan növekednek, addig a *S. pombe* micéliumának egységét az elágazások hálózata által összetartott, vastkosabb szerkezetek, a kötegek biztosítják. Bár ezeken belül a szerkezet stabilitása érdekében a hifák egymással érintkezve növekszenek, a kötegek mégis a *S. japonicus* hifáihoz hasonlóan sugárirányban terjednek. Az agarkockákról és a tárgylemezek segítségével készített képeken jól látható, hogy sem *S. japonicus*, sem a *S. pombe* élesztő-micélium átalakulására nem jellemző a homogenitás. Az 1. ábrán bemutatott *S. japonicus* 7-1 törzs esetében is látható, hogy az átalakulás a kihúzott tenyészet bizonyos pontjain indult meg, hasonlóan az 5.1.3.1.-es fejezetben bemutatott 14. ábrán látható *S. pombe* tenyészetéhez. Az élesztő-micélium átalakulás mindkét fajnál hasonlóan, a tenyészet perifériális részein játszódtott le. A tenyészet középső részein az élesztőforma dominált. Amíg a *S. japonicus*-nál hamarosan növekedésnek indultak a hifák, addig a *S. pombe* élesztősejtjei fokozatosan meghosszabbodva lassan egy hifához hasonló, köteges szerkezetet hoznak létre, amelyben szintén vannak elágazások is. A táptalajba behatoló kötegek vezető szálainak csúcssejtjei meghosszabbodott

képet mutatnak, ami azonos a *S. japonicus* hifáinál látottakkal. A köteg belsejében lévő invazív hifák jellegzetesen rövidebbek és rövid sejtekből állnak. A mikroszkópos megfigyeléseink során a *S. pombe* esetében alkalmazott citoplazmában felszaporodó zöld fluoreszcens protein révén láthatóvá vált a szeptum, és esetenként a sejtmag elhelyezkedését és számát is meg tudtuk adni. A felvételek alapján úgy tűnik, hogy a *S. pombe* micéliumát alkotó hifákban a sejteket szeptum választja el egymástól, a hifasejteken egy sejtmag található, és hasonlóan a közeli rokonához az elágazások a szeptum alól indulnak ki.

### **6.1.3 Vakuólumok szerepe a hifa növekedésben**

A két faj micélium-képzésének összehasonlítása során lehetőségünk volt a vakuólumok megfigyelésére is a *S. pombe* és *S. japonicus* hifasejteken. A 3.2.6.1. számú fejezetben ismertettük, hogy számos dimorf gombafajnál (a *S. japonicus*-nál is) a vakuólumok fontos szerepet játszanak az élesztő-micélium átalakulás során. Ezért úgy gondoltuk, hogy a dimorfizmus szempontjából érdekes lehet a vakuólumok számának, méretének és elhelyezkedésének vizsgálata az élesztősejteken és a micéliumokat alkotó fonalakban.

A sarjadzó élesztő *Sa. cerevisiae* élesztősejtjeiben kevés, 1-3 nagyobb méretű vakuólumot találunk. A pszeudomicéliumokat alkotó leánysejtek ilyen szempontból nem különböznek az anyasejtől (Vida és Emr, 1995). Nagyobb méretű és kisszámú vakuólumot találunk a *C. albicans* és a *Y. lipolytica* sejtjeiben (Gow és Gooday, 1982, Swennen és Beckerich, 2007). Ugyanakkor, a *C. albicans* hifáiban a vakuólum fúziót követően akár teljes sejteket tölthet ki a vakuólum (Barelle és tsi, 2003). A *S. pombe* és a *S. japonicus* élesztősejtjei nagyobb számban kis és közepes méretű vakuólumokat hordoznak (Bone és tsi, 1998, Gachet és Hyams, 2005,

Sipiczki és tsi, 1998b). A *S. pombe* néhány sejtes hifáiban az élesztősejtek vakuolumaihoz hasonló méretű és mennyiségű vakuólumot láttunk a minták CDCFDA festését követően. Az idősebb micélium fonalaiban megfigyelt, intenzív fluoreszcens jelből kiindulva (lásd a magyarázatot alább) feltételezhetően nem változik a vakuólumok mérete, azaz a *S. japonicus* esetében megjelenő poláris, óriás vakuólumokat a *S. pombe* mintákban nem láttuk. Ez arra utalhat, hogy a *S. pombe* esetében a vakuólumok nem töltenek be jelentős szerepet a micéliális növekedés során. Ugyanakkor a hifák vakuoláris mintázatának további vizsgálata szükséges.

Mikroszkópos megfigyeléseink szerint a *S. japonicus* vad típusú tenyészetében az élesztősejtek vakuólumainak alakja dinamikusan változik: a gömb alakútól a tubulárisig. A hifákban a vakuólumok mérete és alakja a hifacsúcstól való távolságtól, valamint a hifasejt fejlődésétől függött (az ovális, kerek, kis és közepes méretű vakuólumok leginkább a csúcssejtek szubapikális régióiban, az óriás vakuólumok pedig a csúcssejtektől távolabb figyelhetőek meg.) Ez a vakuoláris elrendeződés, a fonalas gomba *Aspergillus oryzae*-nál megfigyelt elrendeződéshez hasonlít (Shoji és tsi, 2006). A 19. ábrán bemutatott hifasejtekben lejátszódott vakuólum fúzió azt a feltevésünket bizonyítja, amely szerint vakuólumok fúziója az élesztősejtekhez hasonlóan a hifasejtekben is végbemegy, így nemcsak az élesztő-micélium átalakuláshoz, hanem a hifa további növekedéséhez is szükséges.

## **6.2. Az endocitózis nyomon követése a *S. japonicus* sejtjeiben**

A vakuólumok egyben az endocitotikus útvonal résztvevői is. Az endocitózis a membrántranszport révén jelentős szerepet játszik a tápanyag felvételben, a membrán receptorok szabályozásában, a transzporterek és ioncsatornák, valamint a membránok újrahasznosításában, ezáltal fontos

szerepet tölt be a hifák apikális növekedésében (pl. Fisher-Parton és tsi, 2000, Peñalva, 2005). Az FM4-64 fluoreszcens festék segítségével (Vida és Emr, 1995) a *S. japonicus* élő sejtjeiben is nyomon követtük ezt az útvonalat. A *S. japonicus* élesztősejtjeiben az endocitózis útvonala a *S. pombe* élesztősejtjeiben a korábban mások által tapasztaltaknak felelt meg (Gachet és Hyams, 2005). A két faj FM4-64 felvételének gyorsasága az egyik különbség, amit észrevehetünk. A *S. japonicus* élesztősejtek a *S. pombe*-hoz képest nagyobbak, ami a festék felvételének lassulását eredményezte, ez pedig alkalmat adott arra, hogy az első lépéseket könnyebben dokumentálhassuk. A felvételt követően a festék további útja időben és a lépéseket tekintve nem tért el a *S. pombe* esetében, korábban mások által leírt útvonaltól (Gachet és Hyams, 2005).

A hosszabb inkubálás után készített képeken jól látható, hogy a *S. japonicus* esetében, a hifacsúcs közelében nagy mennyiségű FM4-64 festék halmozódott fel. Annak ellenére, hogy a csúcsi részek kevés vakuólumot tartalmaznak, mégis kiemelkedően erős jelet tapasztaltunk. A csúcstól távolabb eső sejtek gyengébben festődtek, ami azt sugallja, hogy a festék felvétel nem korlátozható csak a hifa csúcsi részére, de ott aktívabb. Számos fonalas gomba esetén bebizonyították, hogy a szubapikális sejtek esetében is jelentős FM4-64 felvétel tapasztalható, ugyanakkor a festék felvétel gyorsabb volt a hifacsúcsnál (Fisher-Parton és tsi, 2000). A *S. japonicus* hifái esetében a jelintenzitás az adott sejt citoplazma mennyiségétől és a hifacsúcsból való távolságától is függött. Ha egy közbülső sejt elágazást hozott létre, tehát elegendő citoplazmával rendelkezett a növekedés megindításához, abban a sejtben a jel erőssége is nagyobb volt, különösen az új elágazás csúcán. A vakuóllummal teljesen kitöltött, közbülső sejtek esetében csak a sejtmembrán piros vonala rajzolódott ki. Úgy gondoljuk, hogy a hifacsúcsoknál tapasztalt

erős jel azzal az aktív membrán transzporttal magyarázható, ami elsődlegesen ezen a helyen keresztül játszódik le és a hifacsúcs növekedését szolgálja.

A különböző korú *S. japonicus* tenyészetek CDCFDA-val történő kezelése után azt tapasztaltuk, hogy a nagyobb méretű vakuólumokkal rendelkező hifasejtekben kevésbé intenzív jelet kaptunk, mint a kisebbeket tartalmazó élesztősejtekben. Ennek az lehet az egyik magyarázata, hogy az élesztősejtek kisebb térfogatuknál fogva gyorsabban veszik fel és hatékonyabban juttatják el vakuólumaikba a festéket, mint a nagyobb méretű hifák. A másik magyarázat az lehet, hogy a nagy térfogatban ugyanaz a festék mennyiség kisebb koncentrációban van jelen, vagy a lehetséges harmadik ok az óriás és a kisebb méretű vakuólumok pH-jának különbsége. Breeuwer és társai 1995-ben született cikkükben két faktortól teszik függővé a jelintenzitást. Az egyik a bejutott fluoreszcens anyag koncentrációja, amelyet az észteráz aktivitás, és az anyag kiáramlása befolyásol, és a másik az intracelluláris pH. Ez utóbbi hatással van az észteráz aktivitásra, amely optimális pH mellett a nem-fluoreszcens karboxi-DCFDA acetát csoportját eltávolítva fluoreszcens fluorofort, az 5-(és-6)-karboxi-2',7'-diklórfloresceint hozza létre. A jelintenzitás így a belső savas pH mérésére is alkalmas (Nedergaard és tsi, 1990). Ez alapján feltételezhető, hogy a *S. japonicus* nagyobb vakuólumainak kémhatása a lúgosabb felé tolódott el.

### **6.3. A *S. japonicus* 7-1 élesztő-micélium átalakulását befolyásoló vegyületek**

Az élesztő-micélium átalakulást számos indukáló és gátló tényező befolyásolja. A baktériumok és az újabb kutatási eredmények szerint a gombák is kismolekulák segítségével kommunikálnak egymással (pl. Withers és tsi, 2001, Nickerson és tsi, 2006). Ezt nevezzük „quorum sensing” szignálmechanizmusnak. A QS azt a jelenséget írja le a mikroorganizmusok

között, amelyben az egyedi sejtek kis molekulatömegű jelző részecskék segítségével érzékelik, ha a populáció elérte azt a minimális egységet, vagy „quorumot”, amely az egész populációra ható választ indukál. A „sensing” a körülmények érzékelésére utal, ilyenek például az egyedsűrűség, tápoldat összetétele, vagy más fajok egyedeinek jelenléte (pl. Williams és tsi, 2000, Hornby és tsi, 2001, Nickerson és tsi, 2006). A quorum sensing jelenségét részletesen jellemezték a baktériumok körében, de a gombákat kevesen tanulmányozták, irodalmuk meglehetősen korlátozott. A *C. albicans*, esetében 2001-ben kezdődtek el az ilyen jellegű kutatások (Hornby és tsi, 2001). Napjainkig számos más gombafaj esetében beszámoltak hasonló szignálmechanizmusról (pl. Nickerson és tsi, 2006, Lorek és tsi, 2008, Derengowski és tsi, 2009). Az eddig azonosított vegyületek, szignálútvonalak, enzimek és inhibitorok jelentősége az élesztő-micélium átalakulás gátlásán keresztül, a virulencia csökkentésében rejlik, ezért is olyan fontos a kutatása patogén gombafajok esetében (Derengowski és tsi, 2009). A *C. albicans* esetében a farnezol volt az egyik ilyen azonosított vegyület (Hornby és tsi, 2001). A *C. albicans* esetében a farnezol micéliumképzést befolyásoló koncentrációja több tényezőtől függ. A dimorf átalakulást kiváltó három legfontosabb anyag az L-prolin, N-acetilglükózamin és a szérum. Az utóbbi esetében a tápoldat szérum tartalmától függően maximum 250  $\mu\text{M}$  is lehet a minimális gátlókoncentráció, de a vizsgált egyéb tápoldatokban már 1-2  $\mu\text{M}$  farnezol is 50%-al csökkentette a csírcsövek kialakulását. Ez a hatás azonban a tenyészet növekedését nem befolyásolta (Mosel és tsi, 2005). *P. brasiliensis*-nél 25  $\mu\text{M}$ -nál nagyobb koncentrációban jelenlévő farnezol befolyásolja a tenyészet növekedését és a *C. albicans*-hoz hasonlóan ez a koncentráció késleltette a dimorf átalakulást (Derengowski és tsi, 2009). A *S. japonicus*-nál általunk mért farnezol koncentráció, amely megakadályozta az élesztő-micélium átalakulást, 5mM-

os volt. A tenyészet növekedését ez a koncentráció jelentősen nem befolyásolta. Tehát ez az anyag a *S. japonicus* dimorf átalakulására is hatással van. A *S. japonicus*-szal végzett vizsgálatainkat szilárd táptalajon (YEA) végeztük, hiszen ez az egyik körülmény, amely az élesztő-micélium átalakuláshoz szükséges. A *C. albicans* esetében viszont a farnezolt a tápfolyadékhoz adták. A két táptalaj fizikai formája, emiatt a molekulák lassabb diffúziója lehet az egyik magyarázata annak, hogy a gátló hatás eléréséhez a két fajban akár ezerszeres is lehet a fonalas növekedést gátló koncentrációk különbsége. A *S. japonicus* élesztő-micélium átalakulását szintén gátolta az aszpirin, vagy acetil-szalicilsav. Ezt a vegyületet tesztelték a *C. albicans* esetében is, ahol 1mM-os koncentráció 95%-al csökkentette a biofilm kialakulását, amely gyógyászati alkalmazásoknál nagyon hasznos lehet. A biofilm kialakulás gátlása ellenére a tenyészetben élesztő és fonalas formát továbbra is megfigyeltek (Alem és Douglas, 2004). A *S. japonicus* esetében 2 mM-os koncentrációnál tapasztaltunk eltérést a micélium növekedésben a kontrol tenyészetéhez képest. A koncentráció további növelése már a hifák kialakulását is gátolta, de egyben a tenyészet életképességét is rontotta. A magasabb aszpirin tartalmú csészéken a sejtek szeptációjának elmaradása a *C. albicans*-nál (Alem és Douglas, 2004) és a *S. japonicus*-nál is megfigyelhető volt.

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

A micélium-képzés hátterében álló folyamatok megismerésének érdekében klasszikus genetikai módszerek felhasználásával *S. japonicus* micélium negatív ( $myc^-$ ) mutáns törzsek izolálását és rekombinációs analízisét végeztük el. Nyolc új micélium negatív mutáns törzssel bővült törzsgyűjteményünk, amely hat *myc* gént reprezentál, amelyek a *S. japonicus*

élesztő-micélium átalakulásában vesznek részt. Így jelenleg, a Bozsik és társai által leírttal együtt, az élesztő-micélium átalakulásban résztvevő 7 gént ismerünk: *myc1* (myc-4, myc-10, myc-36 and myc-37 allélok), *myc2* (myc-31 allél), *myc3* (myc-34 allél), *myc4* (myc-35 allél), *myc5* (myc-39 allél), *myc6* (myc-43 allél), *myc7* (myc-56 allél).

Az izolált *myc<sup>-</sup>* mutánsainknál a micélium-képzés elmaradását okozó mutációk morfológiai és citológiai változásokkal jártak. Az általunk vizsgált tulajdonságok, mint az élesztő sejtalak és annak változása, a szeptum-képzés, a vakuólum méret és eloszlás, valamint az aktin elrendeződés a micélium képzés során igen nagy jelentőséggel bírnak (a törzsek jellegzetességeit a Melléklet 3. táblázatában mutatjuk be). A sejtalak szerint *myc<sup>-</sup>* mutánsainkat három csoportba soroltuk: sep-szerű, kerek és rövid sejtek. Mint ahogy az eredményeinkben bemutattuk, az egyes mutációk a szigorúan szabályozott folyamatok felborulásához vezettek, számos jól dokumentálható változást okozva.

A *myc<sup>-</sup>* mutánsok segítségével azonosított, az átalakulásban résztvevő *S. japonicus* gének funkcióit még nem ismerjük, de a dimorf átalakulásra képes fajok irodalmi adatai és a mutánsainknál megfigyelt egyedi jellegek alapján következtetéseket vonhatunk le arról, hogy az élesztő-micélium átalakulás melyik lépésében vehetnek részt.

Ha a sejt nem megfelelően válaszol a nitrogén mennyiségének csökkenésére, feltételezhető, hogy hiba történik a párosodás, valamint az élesztő-micélium átalakulás folyamataiban. A TOR szignál útvonal a nitrogén-éhezésre, hőmérsékleti és ozmotikus stresszekre adott válasz kialakításában egyaránt szerepet játszik a *S. pombe* sejtjeiben (Kawai és tsi, 2001). Ez az útvonal több konzervatív fehérjét tartalmaz például a Tsc1/2p, Rheb fehérje, Tor1/2p (Aspuria és tsi, 2007). Két kulcsszereplője a Tor1p és a Tor2p kinázok. Mutációjuk ellentétes hatást fejt ki: míg nitrogén-mentes,



spórátató táptalajon tenyésztve a *tor1Δ* sejtek teljesen sterilek, a tenyészetben továbbra is hosszúkás sejtek találhatóak, addig a komplett táptalajon tenyésztett *tor2Δ* mutánsok belépnek a szexuális ciklusba, sejteik kisebbek, rövidebbek (Weisman és tsi, 2007). Az általunk izolált *S. japonicus* mutánsok között több steril törzset is azonosítottunk a *myc<sup>-</sup>* tulajdonsággal párosulva. E mellett mutánsaink között találtunk ozmotikus stresszre igen érzékenyeket is. Ha feltételezzük, hogy a *S. japonicus* is rendelkezik a TOR-hoz hasonló mechanizmussal, akkor elképzelhető, hogy a *myc<sup>-</sup>* mutánsainknál tapasztalt sterilitás és ozmotikus érzékenység összefüggésbe hozható a TOR jelátviteli útvonal valamelyik résztvevőjének mutációjával. Hiszen a *S. pombe* TSC/Rheb/TOR jelátviteli útvonala számos folyamatot befolyásol, így a növekedésre és a sejtciklusra, a párosodásra, az aminosav felvételre, és a stresszválaszra is hatással van. Valószínűsíthető, hogy a MAP kinázokkal összhangban részt vesz a különböző stressz tényezők kiváltotta válaszfolyamatok szabályozásában (pl. Kawai és tsi, 2001, Van Slegtenhorst és tsi, 2004, Nakase és tsi, 2006, Weisman és tsi, 2007, Aspúria és tsi, 2007). Sajnos a *S. pombe* micélium-képzésének és a TOR szignál útvonalnak kapcsolatáról nincs irodalmi adat. A *S. pombe* L975-ös törzskönyvi számú, micélium-képzésre képes törzsének, élesztő és micéliális tenyészetéből izolált peptidek tömegspektrometriai analízise után ugyanakkor az egyik fehérje, amely a micéliális mintánkban kimutatható, de az élesztő mintánkból nem, az SPBC16A3.08c gén által kódolt fehérje. Ez a *S. pombe* adatbázisban talált információ szerint a TOR szignálútvonallal áll kapcsolatban. A fehérje *Sa. cerevisiae* homológja, az *Stm1p*, feltételezhetően a transzkripciót befolyásolja tápanyag hiányos stressz körülmények között és együttműködik a TOR jelátviteli útvonallal (Van Dyke és tsi, 2006). Egy másik, a fonalas alak kialakulása szempontjából érdekes fehérje is van a 11 csak micéliális mintából kimutatottak között: ez egy konzervatív gombafehérje, amelyet az

SPCC757.03c gén kódol. Ennek *Sa. cerevisiae* homológja a SNO4 proteint kódoló gén. Diszrupcióját követően a fonalas alak kialakulása csökkent mértékű, e mellett pedig az invazív növekedés elmaradása figyelhető meg (Jin és tsi, 2008). Jin és munkatársainak a fonalas növekedést vizsgáló analízise egy másik érdekes következtetéssel is járt: számos olyan gént azonosítottak, amelyek a fonalas alak kialakulásának befolyásolása mellett a mitokondriális működéshez is hozzájárultak (Kang és Jiang, 2005, Jin és tsi, 2008). Feltételezik, hogy a mitokondriális szignálok a retrográd útvonalon keresztül (amely a mitokondrium és a sejtmag közötti kommunikációt segíti, a *Sa. cerevisiae* esetében a mitokondriális működési zavar érzékelésére szolgál) befolyásolják a fonalas növekedést (pl. Butow és Avadhani, 2004). A korábbi eredmények szerint ez az útvonal pedig kapcsolatban áll a TOR útvonallal (Komeili és tsi, 2000). Az általunk azonosított 11 *S. pombe* fehérjéből öt a mitokondriumban található: NAD-függő malát enzim, citrát szintetáz, ubikinol citokróm c reduktáz komplex központi fehérje, citokróm c oxidáz alegység V és citokróm c.

A *Y. lipolytica*-ban szintén elvégeztek egy összehasonlítást az élesztőmicélium átalakulás során termelődő fehérjéket illetően (Morin és tsi, 2007). 9 fehérje mutatott eltérő mintázatot a 2D gélen. A különbözőként expresszáldott fehérjék metabolikus útvonalban és stresszválaszban vettek részt.

Az általunk vizsgált *S. pombe* mintákból kimutatott fehérjék száma egyik esetben sem elegendő ahhoz, hogy teljes körű elemzést és biztos következtetéseket vonjunk le a két formában megtalálható proteinekről, de ilyen jellegű vizsgálatokat még *S. pombe*-ban mások sem végeztek. A két minta között különbséget találtunk a fehérjeszintézisben részt vevő fehérjék arányában. Ez magyarázható azzal, hogy a *S. pombe* esetében az invazív

micéliumok kialakulása nem egy kedvező állapot, amely a fehérjeszintézis lassulásához vezethet.

A Melléklet 3. táblázatában jellemzett mutánsaink pleiotróp fenotípusait eredményezhették olyan gének mutációi is, amelyek több folyamat koordinálásáért felelősek. Ezek lehetnek például mediátor funkcióval rendelkező fehérjék, vagy transzkripciós regulátorok. *sep*-szerű növekedést mutató mutánsaink (7-63, 7-96, 7-156, 7-159 és 7-163-as törzskönyvi számú mutánsok) elnevezése a *S. pombe sep1-1* törzsének hasonló mikrohifái alapján történt (Sipiczki és tsi, 1993). A Sep1p fork-head típusú transzkripciós faktor, amely azoknak az enzimeket kódoló géneknek a regulátora, amelyek a szeptum és sejtfal poliszacharidjainak a lebontását végzik a leánysejtek szeparációjakor a sejtosztódás során (Alonzo-Nunez és tsi, 2005). Jelenlegi ismereteink szerint szerepe a sejtseparációban betöltötténél jóval szélesebb körű (Rustici és tsi, 2004). Ha a Sep1p inaktiválódik, a sejt szeparációja nem történik meg, a leánysejtek együtt maradnak, kialakítva a jellegzetes többsejtes, hifára emlékeztető struktúrát. Ezek a mikrohifák azonban nem azonosak a *S. japonicus* valódi hifáival. Az egyik legfontosabb különbség a növekedés polaritásában van, amely a valódi hifákban jellegzetesen monopoláris, míg a mikrohifákban bipoláris. A *S. japonicus* *sep*-szerű mutánsainak a telepei körül nem alakul ki valódi micélium, ami megerősíti azt a korábbi megfigyelést, hogy a sejtek együtt maradása nem elégséges feltétele az élesztő-micélium átalakulásnak (Sipiczki és tsi, 1998a). A *S. pombe sep1* gén befolyásolja egy másik transzkripciós faktor, az Ace2p expresszióját. Az Ace2p által szabályozott gének által kódolt enzimek, például az Eng1p és az Agn1p, a szeptum szétválásában vesznek részt. Az *ace2Δ* sejtek a *sep1Δ* sejtekhez hasonló mikrohifákkal rendelkeznek (Martin-Cuadrado és tsi, 2003, Sipiczki, 2007). A *S. pombe* további 15 izolált *sep* génjében sérült mutánsok vizsgálata során szintén

tapasztalták, hogy több egymástól látszólag független szabályzó útvonal sérülhet: a szexuális differenciálódás elindítása G1-ben, a sejtsztódás szabályozása az M fázisban és az ozmotikus érzékenység (Grallert és tsi, 1999). A *S. pombe* sep mutánsaihoz hasonlóan a *S. japonicus* sep-szerű mutánsai esetében is megfigyeltük a sejtszeparáció hiányát, a fertilitás csökkenését és az ozmotikus érzékenységet. A *S. pombe* Sep10p, Sep11p, Sep15p fehérjéi mediátor komplex alegységek, amelyek a transzkripció szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszanak (Szilagyai és tsi, 2002, Miklos és tsi, 2008). A sep9 gén a *Sa. cerevisiae* SPT8-hoz hasonló fehérjét kódol, amely a SAGA komplex egyik alegysége (Batta és tsi, 2009). A *C. albicans* esetében is megvizsgálták az egyetlen fork-head transzkripció faktor (CaFKH2) szerepét. A vizsgálatok kimutatták, hogy a CaFKH2 nagyon fontos szerepet játszik a különböző sejtípusok közötti átváltásban és a virulencia kialakításában is. Hiányában konstitutív pszeudohifa-képzés lép fel. Transzkripció regulátora a Cyb4p-nek (egy B-típusú ciklin) és számos hifaszpecifikus és sejtszeparációban részt vevő fehérjének (Bensen és tsi, 2002). A *C. albicans* három másik a micélium-képzés szempontjából kiemelten fontos transzkripció regulátora az EFG1, CPH1 és a TUP1 (Braun és Johnson, 2000).

Az öt *S. japonicus* sep-szerűen növekedő mutáns közül adataink szerint három (7-63, 7-96, 7-156) azonos génben sérült. Az utóbbiakkal feltehetően vagy azonos génben sérült, vagy azonos kapcsoltságú a csoportba tartozik a 7-157-es mutáns is, de ez a mutáns nem mutat sep-szerűséget, hanem a sejtjei vad típusúak vagy lekerekedettek. Az egyik lehetséges magyarázat erre a különbségre az, hogy a génterméknek (fehérjének) több funkciója is lehet a sejtben. Attól függően, hogy hol van benne a mutáció, csak az egyik funkciója esik ki (a hifázás elmarad), vagy az összes, ami teljes funkcióvesztéssel jár (a micélium-képzésen kívül más is sérül). A másik

magyarázat pedig az lehet, hogy a 7-157-es törzs nem allélikus a három sepszerű mutánsnal, hanem egy eltérő génben sérült, amely azonban nagyon szorosan kapcsolódik a bennük sérült génnel és emiatt csak olyan kis valószínűséggel játszódik le a rekombináció, hogy a keresztezések során nem találtunk a vizsgált utódok között  $myc^+$  fenotípusú szegregánst.

A *S. pombe sph-* (spherical) mutáns törzseinél, hasonlóan a 7-154, 7-155, 7-176-os mutánsainkhoz, kerek, izotróp módon növekvő sejtekkel találkozhatunk, amelyek random aktin eloszlást mutatnak (Sipiczki és tsi, 2000b). Az aktin sejtváza alapvető szerepet játszik a sejt polarizációjában, morfogenezisben, az organellek eloszlásában és a citokinezisben (Drubin és Nelson, 1996). A vad típusú, hosszúkás *S. pombe* és *S. japonicus* sejteknél az aktin a növekvő sejtvégeken és osztódáskor az osztódás síkjában figyelhető meg (Marks és tsi, 1986, Sipiczki és tsi, 1998b). A mutánsoknál tapasztalt apoláros aktin eloszlás okozhatja poláris növekedésre való képességük elvesztését, és magyarázatot adhat arra, hogy az izotróp módon növekvő mutánsaink miért nem képesek micélium fejlesztésre. Hiszen a hifák kialakulásának alapvető feltétele az aktin polarizált, unipoláris elrendeződése (Sipiczki és tsi, 1998b, Harris és Momany, 2004). A kerek sejtalak e mellett még sterilitással is párosult. A *S. japonicus* kerek sejteket képző  $myc^-$  mutánsaiban sem találtunk ivari folyamatokra utaló jeleket, azaz konjugációhoz megnyúlt sejteket, zigótákat, aszkuszokat és szabad spórákat. Valószínűleg a polaritás hiánya lehet az oka annak, hogy a konjugációs csövek nem alakulnak ki, így nem történik meg a párosodás sem, hasonlóképpen ahhoz, amit a *S. pombe*-nél korábban leírtak (Sipiczki és tsi, 2000b).

A sejtciklus, vagy a sejt polaritás mutációi mellett a sejt fal szerkezetének módosulása is okozhatja a sejtalak megváltozását, például kerek sejtek kialakulását (Ribas és tsi, 1991). A sejt fal szerkezetének gyengülése következtében ez a kevésbé merev struktúra a sejtalak fenntartásában már

kevésbé játszik szerepet. Ezzel egyidejűleg a sejtben fennálló citoplazmatikus turgor „kikerekíti” a sejteket és emiatt kerekesebb sejteket láthatunk a mikroszkóp alatt. A sejtfa szerkezetének sérülése fokozhatja a sejtfa érzékenységét a sejtfaalkotó poliszaccharidokat bontó enzimekkel szemben. Ebből kiindulva megnéztük a mutánsaink  $\beta$ -glükánáz érzékenységét. A *S. japonicus* kerek mutánsai érzékenyebbeknek bizonyultak. Közülük a 7-176-os törzskönyvi számú mutatta a legnagyobb  $\beta$ -glükánáz érzékenységet: már 10 perces inkubálás után a sejtek 50%-a elpusztult. Tehát a 7-176-os mutáns sejtek lekerekedését valószínűleg a sejtfa összetétel megváltozása okozta, vagy ez is lehetett az egyik ok. Érdekes itt megemlíteni, hogy a *C. albicans* esetében a sejtfa  $\beta$ -1,6-glükán tartalmának csökkenése az élesztő-micélium átalakulás elmaradásához vezetett, ami egyben a patogenitás elvesztését is okozta (Herrero és tsi, 2004).

A sejt polaritás elvesztése és a sejtfa szerkezetének megváltozása más módon is összefügghet. Kerek mutánsaink esetében a 42. ábrán bemutattuk, hogy a kalkofluorral történő festést követően a sejt felszínén szabálytalanul és véletlenszerűen lerakódott szeptum anyag foltjai láthatóak. Ezek a lerakódások szintén a sejt polaritás elvesztésének eredményeként, a szabályozatlan transzport folyamatok miatt alakulhattak ki.

Szinte minden vizsgált *S. japonicus* mutáns törzsnél találtunk valamilyen eltérést a vakuólumok mérete, eloszlása, vagy száma szerint. A fonalas alak kialakulásának egyik alapvető feltétele a poláris helyzetű, óriás vakuólum kialakulása a sejtvégeken (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b). Ezek az egyik sejtvégen elhelyezkedő vakuólumok egyrészt az azonos vég növekedését gátolják, másrészt a sejt növekedését is felgyorsítják térfogatuk kis energia befektetéssel járó kiterjesztésével. Három kerek (7-154, 7-155, 7-176-os törzskönyvi számú) és két a vad típushoz hasonló élesztő sejtalakkal rendelkező (7-156, 7-157-es törzskönyvi számú) mutánsunknál a vad típusú

sejtekhez képest kisebb méretű, de nagyobb számú vakuólumot figyeltünk meg a sejtekben. Erre a vakuólum fúzió elmaradása lehet az egyik magyarázat.

A *C. albicans wall* mutáns sejtei is izotróp növekedésűek és random aktin elrendeződést mutattak. Ehhez a néhány fenotípushoz további, a vad típustól eltérő jellegek párosultak: a sejtekben a megszokott 1-3 nagyobb méretű vakuólum helyett sok kisebb méretű vakuólum alakult ki, valamint az endocitózis lelassult. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy a mutáció hatására elmaradt a *C. albicans* valódi hifáinak kialakulása. A *WALI* fehérje a humán Wiskott-Aldrich Szindróma proteinnel homológ (WASP), amelynek az aktin sejtvázs reorganizációjában is fontos szerepe van. Ez a fehérje a *C. albicans* esetében a homotípusos vakuólum fúzió egyik résztvevője is lehet (Walther és Wendland, 2004). A *S. pombe* WASP homológját is megvizsgálták, a *wsp1Δ* mutánsok esetében depolarizált aktin elrendeződést, csökkent fertilitást, és ozmotikus érzékenységet találtak. A *S. pombe* esetében feltételezik, hogy ez a fehérje a miozin-I-gyel együtt (aktin dependens molekuláris motor), az aktin összeszerelésében vesz részt (Lee és tsi, 2000).

A vakuólum fúzió a *S. pombe* sejteiben a Styl útvonala által szabályozott és a V típusú miozin (Myo52) közreműködésével valósul meg (Bone és tsi, 1998, Mulvihill és tsi, 2001). A *myo52Δ* sejtek vakuólumai kisebbek, mint a vad típuséi és még hipoozmotikus körülmények között sem képesek fúzióra (Mulvihill és tsi, 2001). Hasonlóan kisméretű vakuóllummal rendelkeznek a *S. pombe ypt7* mutáns sejtek is (Bone és tsi, 1998). A gén egy Rab proteint kódol, amely a *Sa. cerevisiae* esetében a *in vivo* vakuólum fúzió egyik fontos résztvevője (Haas és tsi, 1995).

A 7-163-as törzs sejteiben ezzel ellentétben, a bemutatott képek és megfigyeléseink szerint lejátszódik a vakuólumok fúziója, amely nagyméretű, nem poláris elhelyezkedésű, szabálytalan alakú vakuólumok

kialakulását eredményezi. Ezek a vakuólumok azt is bizonyítják, hogy a vakuólum fúzió szükséges, de nem elégséges feltétele a *S. japonicus* micélium-képzésének, ahogyan azt korábban is sejtették (Sipiczki és tsi, 1998b). A vakuólumok fuzionálnak ugyan, de a sejtek mérete jelentősen nem változik. Így a vakuólumok a sejtek térfogatának túlnyomó részét kitöltik, kevés helyet hagyva az egyéb sejtalkotóknak. Ennek a mutáns fenotípusnak az okát kereshetjük például a vakuólum fúzió szabályozásában, a vakuólum membránjának lebontásában bekövetkezett hibákban, a sejtfal szerkezetének sérülése miatt a fokozott folyadék felvételben is. A 7-163-as törzskönyvi számú mutáns esetében a klorid és a  $\beta$ -glükánáz tesztek elemzésekor a vadhoz képest nagyobb érzékenységet találtunk, ami a sejtfal összetételének változására utalhat. A *S. pombe* *ypt71* génterméke, amely a korábban említett Ypt7p-el együtt a Rab fehérjecsald tagjai, a vakuólum fúziót gátolhatja, mégpedig az Ypt7p-en keresztül. A *ypt71* mutáns sejteken belül ezért óriás vakuólumokat találtak (Kashiwazaki és tsi, 2009).

A *S. pombe* heterotallikus vad törzsei a nitrogén forrás elvonása után néhány osztódást követően nyugalmi állapotba (quiescence) kerülnek. A nyugalmi állapotba került tenyészet ellenállóvá válik különböző stressz hatásokra, és a fennmaradáshoz elegendő aktivitással, metabolizmussal rendelkezik. Ezt az állapotot morfológiai változások is kísérik: a sejt hossz csökkenése (lekerekedett sejtek), a sejt polaritás elvesztése, vakuólum-szerű organellumok kialakulása és lipid cseppek megjelenése a citoplazmában (pl. Su és tsi, 1996, Mochida és Yanagida, 2006, Sajiki és tsi, 2009). Érdekes, hogy a nyugalmi állapotba való belépéshez a MAP kináz kaszkád két tagját a Sty1p-t és a Wis1p-t (nitrogénforrás megvonása okozta stressz válaszhoz is szükséges kinázok), a vakuólum fúzióhoz szükséges Ypt5p, Vam6p, Vps11p-t (a HOPS komplex alkotói, amelyek a vakuólum fúzióban vesznek részt) és Wsp1p, End4p fehérjéket (az aktin szerkezetének kialakításához,



endocitózishoz szükséges) találták alapvetően fontosnak (Kaksonen és tsi, 2003, Takegawa és tsi, 2003, Sirotkin és tsi, 2005, Reiter és tsi, 2008, Sajiki és tsi, 2009). Tehát azokat a fehérjéket, amelyek az élesztő-micélium átalakulás esetében is fontos szereplőnek bizonyultak. Mert láthattuk, hogy a sejtpolaritás váltás, a megfelelő aktin elrendeződés, a poláris helyzetű óriás vakuólumok kialakulásához szükséges vakuólum fúzió, a *S. japonicus* esetében is alapvető fontosságú az élesztő-micélium átalakulás során (Sipiczki és tsi, 1998a, 1998b). *Myc<sup>-</sup>* mutánsaink segítségével pedig bemutattuk, hogy ha ezek a folyamatok közvetve, vagy közvetett módon sérülnek, nem következik be a dimorf átalakulás. Kerek, vagy többségében lekerekedett sejteket tartalmazó *S. japonicus* mutánsaink alakját, a sejtpolaritás elvesztését, a dimorf átalakulás elmaradását okozhatta az is, hogy a mutáns sejtek a tenyésztési körülmények ellenére (komplett táptalajon), korábban kerültek nyugalmi állapotba. Dodgson és társai egy *S. pombe* deléciós könyvtár segítségével 12, a micélium kialakulásához szükséges gént azonosítottak. A génekről átíródó fehérjék között szintén szerepelnek például a membrán transzportban, aktin kialakulásában vagy a transzkripciós szabályozásban részt vevő fehérjék. A nyugalmi állapot kialakulása hasonlóan az élesztő-micélium átalakuláshoz citológiai és morfológiai változásokkal jár. Ez is egyfajta alkalmazkodási stratégia, azaz válasz a megváltozott külső körülményekre. Mivel a sejtek morfológiai átalakulása alapvetően azonos lépéseket igényel és a kiváltó tényező a N-éhezés (a nyugalmi állapot esetében a nitrogén hiány, az élesztő-micélium átalakulásnál pedig a nitrogén mennyiség csökkenése), nem meglepő, hogy a két folyamat során, a válaszadásban is hasonló fehérjék vesznek részt.

Mutánsaink között kiemelkedő stressz-érzékenységgel a 7-159-es mutáns rendelkezett. Négy teszt esetében (KCl, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> érzékenység) ezt a mutánst találtuk a legérzékenyebbnek. Érdekes, hogy a

szorbit esetében nem találtunk ilyen mértékű érzékenységet. Ez alapján azt gondolhatjuk, hogy a mutáns sejtek nem az ozmotikus stresszre, hanem a magas klorid koncentrációra érzékenyek. Ehhez hasonló klorid érzékenységet találtak például Grallert és munkatársai a *S. pombe* sep mutánsainak vizsgálatakor (Grallert és tsi, 1999). Mivel a 7-159-es törzskönyvi számú mutánsunk a vadhoz hasonló  $\beta$ -glükánáz érzékenységet mutatta, feltételezhető, hogy nem közvetlenül a sejtfal szerkezetében bekövetkezett mutáció a felelős az érzékenységért. A jelenségre magyarázatot a korábban említett MAP kináz kaszkád sérülése, vagy sérült szabályozása adhat. A *S. pombe* esetében az Spc/Sty/Phh-MAP kináz kaszkád kiemelkedő szerepet játszik a különböző stresszekre adott tolerancia kialakításában: nitrogén-éhezés, magas ozmolaritás, hősokk, magas külső pH (pl. Kato 1996). Egy másik Pmk/Spm1-MAP kináz kaszkád felelős a sejtfal integritás fenntartásához, és az ozmotikus stressz valamint a hőmérséklet stresszre adott megfelelő válaszért (Madrid és tsi, 2006). Feltételezhető, hogy amennyiben léteznek a *S. japonicus*-ban, a *S. pombe*-nél ismertetett MAP kináz kaszkádok, a *S. japonicus* 7-159-es törzskönyvi számú mutánsának stressz-érzékenységére az ezeknek a szabályozásában bekövetkező hiba adhat választ.

Habár a rekombinációs analízis során elvégzett keresztezésekkel célunk az volt, hogy megállapítsuk a *myc<sup>-</sup>* mutánsaink azonos, vagy eltérő génekben sérültek, néhány esetben további adatokat is nyertünk az oktádanalízis során. Feltételezhetően a 7-159-es mutáns, egy másik *sep*-szerű (7-163) és két kerek *myc<sup>-</sup>* mutáns (7-154, 7-155) való keresztezéséből származó, mindkét szülői mutációt hordozó utódja életképtelen. Hasonló letalitást tapasztaltak több *S. pombe* *sep* mutáns esetében. Például a már ismertetett kulcsfontosságú szerepet játszó *sep1* és a *sep15*, valamint a *sep10* és *sep15* mutáns géneket hordozó törzsek keresztezésénél (Grallert és tsi, 1999, Miklos

és tsi, 2008). Valószínűleg ezek a *S. japonicus* mutánsok, olyan meghibásodott géneket hordoztak, amelyek olyan folyamatokban, vagy azok szabályozásában vettek részt, amelyek együttes jelenléte már nem volt kompenzálható a sejtek számára.

A legtöbb párosításnál 60-85%-os spóra-életképességet mértünk. Bozsik és munkatársai 2002-ben megjelent cikkükben már beszámoltak a *S. japonicus* auxotróf mutáns törzseinek keresztezésekor tapasztalt spóra-életképesség hasonló alakulásáról. Az a tény, hogy különböző mutánsok (auxotróf,  $myc^-$ ) keresztezése hasonló eredménnyel járt arra mutathat rá, hogy ez a tulajdonság a *S. japonicus* esetében fajra jellemző, és nem a mutációk káros következménye.

Az itt ismertetett fenotípusok a kiváltó gének sérülésének közvetett, vagy közvetlen eredményeképp a monomorf forma kialakulását eredményezték. Több patogén fajban is megfigyelték, hogy az ilyen mutáns törzsek nem okoznak betegségeket, avirulensekké váltak: például *C. albicans*, *U. maydis* (Lo és tsi, 1997, Braun és Johnson, 2000, Saville és tsi, 2003, Martínez-Espinoza és tsi, 1997). Az általunk izolált  $myc^-$  mutánsok további vizsgálata elvezethet bennünket az átváltásban szereplő fehérjékhez, azok pontos funkciójához és az átváltás mechanizmusának jobb megértéséhez. Ezáltal az eukarióta sejt differenciálódásának egyes lépéseit is jobban megismerhetjük. Jó okunk van feltételezni, hogy a gombák dimorf átváltási mechanizmusainak vannak közös, evolúciós értelemben konzervált elemei. Ezek feltárásával megnyílik a lehetőség arra, hogy olyan „támadáspontokat” keressünk, amelyeken keresztül gátolni lehetne a patogén fajoknál az átváltást, az ártalmatlanabb formából az ártalmasabbá. Ezekhez a „támadáspontok”-hoz lehetne azután specifikus gátló anyagokat keresni, amelyek a gombaellenes hatóanyagok új generációját jelentenék.

## 8. Összefoglalás

A tömlősgomba *S. japonicus* számos olyan kedvező tulajdonsággal rendelkezik, amelyek jól felhasználható modellorganizmussá teszik a dimorfizmus vizsgálatára: könnyen indukálható élesztő-micélium átalakulás, jól dokumentálható citológiai jellegek, haploid genom (amelynek szekvenciáját a Broad Intézet honlapján közzétették), a rendelkezésre álló auxotróf és morfológiai mutációt hordozó törzsekkel bővített törzsgyűjtemény és folyamatosan bővülő molekuláris biológiai módszerkészlet. A vele rokonságban lévő és a sejtciklus kutatásban kiemelkedő szerepet játszó *S. pombe* (2001 Nobel-díj Sir Paul Nurse) invazív micélium-képzése jelenleg még kevésbé ismert, ugyanakkor a rendelkezésre álló molekuláris biológiai eszköztár révén szintén hasznos modellszervezetté válhat az élesztő-micélium átalakulás kutatásában. Ebben a dolgozatban a hangsúlyt e tulajdonság, azaz a dimorfizmus tanulmányozására helyeztük. Az átalakulás háttérben lejátszódó citológiai, genetikai és proteomikai változásokról szerettünk volna, e két hasadó élesztőgomba faj segítségével, minél részletesebb betekintést nyújtani.

Első alkalommal vált lehetővé a *S. pombe* és a *S. japonicus* micélium-képzésének összehasonlítása, a mindkét faj számára élesztő-micélium átalakulást indukáló LNBA táptalajon. Megfigyeléseink szerint az agarba fúródó, invazív fonalak mindkét faj esetében széttartóan növekedtek. 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.

A *S. japonicus* és a *S. pombe* élesztő-micélium átalakulásának kezdeti lépéseit is nyomon követhettük. 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. 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.

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.

A *S. japonicus* élesztő-micélium átalakulásában fontos szerepe van a megfigyelt, poláris óriás vakuólumok kialakulásának. A *S. pombe* élesztő- és hifasejtjeinek vakuólumait CDCFDA festéssel tettük láthatóvá. Mindkét sejttypusban azonos jelintenzitást, ez alapján feltételezhetően azonos méretű vakuólumokat találtunk, tehát tapasztalataink szerint a vakuólumok nem járulnak hozzá a *S. pombe* dimorf átalakulásához.

A *S. japonicus* vad típusú sejtjeinek vakuólumait 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 vakuólumot találtunk: ovális, kerek, tubuláris, amelyeknek a megfelelőit a hifasejtekben is megfigyeltünk.

Kizárólag a hifasejtekben találtunk a sejt térfogatát majdnem teljes mértékben kitöltő vakuólumokat, amelyeknek feltételezéseink szerint lúgosabb a kémhatása, mint a kisebb méretűeknek. A vakuólumok fúzója a hifasejtekben is lejátszódik, ami azt a feltevésünket támasztja alá, hogy a *S. japonicus* vakuólumai a hifáik növekedéséhez is szükségesek.

A vakuólum megjelenítéséhez alkalmazott festékek között találjuk a Vida és Emr által élesztők esetében először használt FM4-64-et. 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. 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 az 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 polaritásától függött.

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 sejtalkalakulást

három csoportba (sep-szerű, kerek és rövid sejtek) sorolt  $myc^-$  mutánsainknál ezeket a folyamatokat vizsgáltuk mikroszkópos, fluoreszcens mikroszkópos technikával. 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, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, szorbittal kiegészített komplett táptalajokon végeztük. Mert úgy gondoltuk, hogy az ezekből a stressz-érzékenység vizsgálatokból származó eredményekből, több adatot gyűjthetünk a mutációk hátterében 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  $\beta$ -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. 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 pszeudomicélium-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.



## Summary

The Ascomycota *Schizosaccharomyces japonicus* has proved to be an attractive model for studying dimorphism. One of its striking features is the easily inducible switch between the yeast-like and the filamentous growth modes. Given its large cell size it is also a well suited model for studying cytological processes. Its haploid genome (the sequence is published on the webpage of the Broad Institute), the collection of auxotrophic and morphological mutant strains and continually expanding molecular biological tool and data resource makes this organism a promising model organism.

Although *S. pombe* (closely related to *S. japonicus*) is better known about its central role in cell cycle regulation research (2001 Nobel-prize, Sir Paul Nurse), its yeast-mycelial growth pattern has been recently described. The availability of numerous molecular tools for *S. pombe* makes this organism an ideal model for further understanding dimorphism.

In this study we put the emphasis on dimorphism, the transition between the yeast and hyphal and pseudohyphal growth patterns. With the help of the two *Schizosaccharomyces* species our aim was to gain more information on the cytological, genetical and proteomical aspects of this transition.

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 for the first time. According to our results the invasive filaments grow away from each other in both cases. The *S. pombe* mycelium, unsimilarly to its close relative, resembling 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 the 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 (they may also experience lack of nutrient, but unlike cells on the edge, are not able to sense any nutrient in the close vicinity, and therefore are not induced to form hyphae).

We could also follow the early steps of the yeast-mycelial transition of *S. japonicus* and *S. pombe*. In the channels of the special microscopy slide filled with media inducing hyphal growth, the *S. pombe* elongated yeast cells arranged in a special order. Later 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) at the edge of the inoculum and yeast cell in the centre. Using the cells producing green fluorescent proteins we could differentiate the septa and nuclei in these hyphae. According to our observation these pseudohyphae cells contains one nucleus per cell.

The mycelium of *S. japonicus* grows 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 condition 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.

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. 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.

Vacuoles of *S. japonicus* wild type cells can be observed without staining in the channels and in case of the agar samples these could 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. We found large vacuoles which filled up most of the cell exclusively in the hyphae cells. We assume that these large vacuoles have more alkaline pH than the smaller ones. According to our observation vacuole fusion takes place in the hyphae cells that supports our hypothesis that vacuoles are needed not only for the switch between yeast and mycelial phases, but for the growth of the hyphae as well.

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. 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. This endocytosis marker had 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 polarization defective mutants proved that the uptake of the dye is cell polarity dependent.

In order to reveal the genes playing important role in the yeast-mycelium transition of *S. japonicus* we isolated mutants defective in the morphology transition (*myc*<sup>-</sup>). After the recombination analysis of the

mutants we identified 6 novel *myc*<sup>-</sup> genes that required for the initiation of the *S. japonicus* hyphal growth. The characteristic morphological traits fell into three categories: sep-like, round and short cells. 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 the actin distribution, vacuole fusion and the cell separation are very important events during the yeast-mycelium transition.

The osmotic stress response of *S. japonicus myc*<sup>-</sup> mutants was tested on media supplemented with KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub> 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  $\beta$ -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. Out of the 149 proteins we have identified 11 that could only be found in the mycelial sample. One of them plays a role in the TOR signaling pathway that could suggest that through nitrogen sensing this pathway could have an important role in the yeast-to-mycelium transition. Another protein identified only from the mycelial peptid sample could also be important in the dimorph phase

transaction: 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 that 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-mycelial transition the mitochondrial retrograde signaling pathway was identified as a key negative regulator of yeast filamentous growth.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Sipiczki Mátyásnak, aki lehetőséget biztosított munkám elvégzésére és hasznos tanácsaival segítette a tanszéken végzett munkámat és ösztönzött a dolgozat elkészítése során is. Köszönetemet fejezem ki a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak a sok segítségért, amit kaptam.

Köszönöm John Amrstrong-nak a lehetőséget, hogy a Sussex Egyetem Biokémia Tanszékén töltött négy hónap alatt elvégezhettem a *S. pombe* dimorfizmusát vizsgáló kísérleteket.

Nagyon köszönöm páromnak és családomnak a kitartást és a biztatást, amely nagymértékben hozzájárult a doktori munka és a dolgozat elkészüléséhez.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Alem MA, Douglas LJ (2004) Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 41-7
2. Alfa C, Fantes P, Hyams J, McLeod M, Warbrick E (1993): Experiments with Fission Yeast. A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
3. Alonso-Nuñez ML, An H, Martín-Cuadrado AB, Mehta S, Petit C, Sipiczki M, del Rey F, Gould KL de Aldana CR (2005) Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. 4: 2003-17
4. Amoah-Buahin E, Bone N, Armstrong J (2005) Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*. 4: 1287-97
5. Aspuria PJ, Sato T, Tamanoi F. (2007) The TSC/Rheb/TOR signaling pathway in fission yeast and mammalian cells: temperature sensitive and constitutive active mutants of TOR. *Cell Cycle* 6: 1692-5
6. Atkinson HA, Daniels A, Read ND (2002). Fungal Genetics and Biology, Live-cell imaging of endocytosis during conidial germination in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* 37: 233-44
7. Bahn YS, Molenda M, Staab JF, Lyman CA, Gordon LJ, Sundstrom P (2007) Genome-wide transcriptional profiling of the cyclic AMP-dependent signaling pathway during morphogenic transitions of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. (12): 2376-90
8. Barelle CJ, Bohula EA, Kron SJ, Wessels D, Soll DR, Schäfer A, Brown AJ, Gow NA (2003) Asynchronous cell cycle and asymmetric

- vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2: 398-410
9. Barelle CJ, Richard ML, Gaillardin C, Gow NA, Brown AJ (2006) *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. Eukaryot Cell. 5: 359-67
  10. Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol Rev. 19: 219-37
  11. Bartnicki-García S (1963) Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. III. Mold-yeast dimorphism of Mucor. Bacteriol Rev 27: 293-304
  12. Basi G, Schmid E, Maundrell K (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. Gene. 123:131-136
  13. Batta G, Szilagyi Z, Laczik M, Sipiczki M (2009) The involvement of the *Schizosaccharomyces pombe* sep9/spt8 gene in the regulation of septum cleavage. FEMS Yeast Res. 9: 757-67
  14. Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews 16: 497–516
  15. Bensen ES, Filler SG, Berman J (2002) A forkhead transcription factor is important for true hyphal as well as yeast morphogenesis in *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 1: 787-98
  16. Betz WJ, Mao F, Smith CB (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. Curr Opin Neurobiol. 6: 365-71
  17. Bolker M (2001) *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. Microbiol. 147: 1395-1401



18. Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc.* 214: 159-73
19. Bozsik A, Szilagy 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
20. Bone N, Millar JB, Toda T, Armstrong J (1998) Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Curr Biol.* 8: 135-44
21. Brakhage AA (1998) Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 547–585
22. Braun BR, Johnson AD (2000) TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* 155: 57-67
23. Breeuwer P, Drocourt JL, Bunschoten N, Zwietering MH, Rombouts FM, Abee T. (1995) Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl Environ Microbiol* 61: 1614-9
24. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 6: 89-117
25. Butow RA, Avadhani NG (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell.* 14: 1-15
26. Cali BM, Doyle TC, Botstein D, Fink GR (1998) Multiple functions for actin during filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 9: 1873-89

27. Crampin H, Finley K, Gerami-Nejad M, Court H, Gale C, Berman J, Sudbery P (2005) *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J Cell Sci* 118: 2935-47
28. Craven RA, Griffiths DJ, Sheldrick KS, Randall RE, Hagan IM, Carr AM (1998) Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*. 221:59-68
29. Derengowski LS, De-Souza-Silva C, Braz SV, Mello-De-Sousa TM, Bão SN, Kyaw CM, Silva-Pereira I (2009) Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 8:13
30. 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
31. Drubin DG, Nelson WJ (1996) Origins of cell polarity. *Cell*. 84: 335-44
32. Dupont PF (1995) *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. *J Am Podiatr Med Assoc*. 85: 104-115
33. 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
34. Erdman S, Snyder M (2001) A filamentous growth response mediated by the yeast mating pathway. *Genetics*. 159: 919-28
35. Eriksson OE, Winka K (1997) Supraordinal taxa of Ascomycota. *Myconet*.

36. Ernst JF (2000) Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146: 1763–1774
37. Felsenstein J (1996) Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Methods Enzymol.* 266: 418–427
38. Fisher-Parton S, Parton RM, Hickey PC, Dijksterhuis J, Atkinson HA, Read ND (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc.* 198: 246-259
39. Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol.* 6: 99
40. Furuya K, Niki H (2009) Isolation of heterothallic haploid and auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces japonicus*. *Yeast.* 26: 221-33
41. Gachet Y, Hyams JS (2005) Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci.* 118: 4231-4242
42. Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter MK (1998) Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science.* 279: 1355-8
43. Gallwitz D, Seidel R (1980) Molecular cloning of the actin gene from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 8: 1043-59
44. Gancedo JM (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews.* 25: 107:123

45. Geli MI, Riezman H (1998) Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J Cell Sci.* 111: 1031-7
46. Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell.* 68: 1077-90
47. Gow NA, Gooday GW (1982) Vacuolation, branch production and linear growth of germ tubes in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 128: 2195-8
48. Gow NA, Gooday GW (1987) Cytological aspects of dimorphism in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol.* 15: 73-8
49. Gow NA (1994) Growth and guidance of the fungal hypha. *Microbiol.* 140: 3193-205
50. Grallert A, I Miklos, Sipiczki M (1997) Division-site selection, cell separation, and formation of anucleate minicells in *Schizosaccharomyces pombe* mutants resistant to cell-wall lytic enzymes. *Protoplasma.* 198: 218–229
51. Grallert A, Grallert B, Zilahi E, Szilagyi Z, Sipiczki M (1999) Eleven novel sep genes of *Schizosaccharomyces pombe* required for efficient cell separation and sexual differentiation. *Yeast.* 15: 669-86
52. Haas A, Scheglmann D, Lazar T, Gallwitz D, Wickner W (1995) The GTPase Ypt7p of *Saccharomyces cerevisiae* is required on both partner vacuoles for the homotypic fusion step of vacuole inheritance. *EMBO J.* 14: 5258-70
53. Harris SD, Momany M (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol.* 41: 391-400
54. Hazan I, Sepulveda-Becerra M, Liu H (2002) Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell.* 13: 134-145

55. Herrero AB, Magnelli P, Mansour MK, Levitz SM, Bussey H, Abeijon C (2004) KRE5 gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryot Cell*. 3: 1423-32
56. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 67: 2982-92
57. Hornby JM, Jacobitz-Kizzier SM, McNeel DJ, Jensen EC, Treves DS, Nickerson KW (2004) Inoculum size effect in dimorphic fungi: extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Appl Environ Microbiol*. 70: 1356-9
58. Howard DH (1962) The morphogenesis of the parasitic forms of dimorphic fungi. *Mycopath*. 18: 127-139
59. Hwang KH, Carapito C, Bohmer S, Leize E, Van Dorselaer A, Bernhardt R (2006) Proteome analysis of *Schizosaccharomyces pombe* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 6: 4115-29
60. Jackson BE, Wilhelmus KR, Mitchell BM (2007) Genetically regulated filamentation contributes to *Candida albicans* virulence during corneal infection. *Microb Pathog*. 42: 88-93
61. Jin R, Dobry CJ, McCown PJ, Kumar A (2008) Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Mol Biol Cell*. 19: 284-96
62. Johnson BF, Calleja GB, Boisclair I, Yoo BY (1979) Cell division in yeasts. III. The biased, asymmetric location of the septum in the fission yeast cell, *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res* 123: 253-259

63. Kaksonen M, Sun Y, Drubin DG (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*. 115: 475-87
64. Kaminskyj SG, Hamer JE (1998) hyp Loci Control Cell Pattern Formation in the Vegetative Mycelium of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 148: 669-680
65. Kang CM, Jiang YW (2005) Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast*. 22: 79-90
66. Kashiwazaki J, Iwaki T, Takegawa K, Shimoda C, Nakamura T (2009) Two fission yeast rab7 homologs, ypt7 and ypt71, play antagonistic roles in the regulation of vacuolar morphology. *Traffic*. 10: 912-24
67. Kato T Jr, Okazaki K, Murakami H, Stettler S, Fantes PA, Okayama H (1996) Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett*. 378: 207-12
68. Kawai M, Nakashima A, Ueno M, Ushimaru T, Aiba K, Doi H, Uritani M (2001) Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr Genet*. 39: 166-74
69. Klionsky DJ, Herman PK, Emr SD 1990 The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev*. 54: 266-92
70. Kron SJ, Styles CA, Fink GR (1994) Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 5: 1003-22
71. Kohli J (1976) Chromosomenkartierung bei *Schizosaccharomyces pombe*. Ph.D. Thesis, University of Bern

72. Komeili A, Wedaman KP, O'Shea EK, Powers T (2000) Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J Cell Biol.* 151: 863-78
73. Kuramae EE, Robert V, Snel B, Boekhout T (2006) Conflicting phylogenetic position of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genomics* 88: 387-93
74. Larsen AD, Sypherd PS (1974) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and morphogenesis in *Mucor racemosus*. *J Bacteriol.* 117 (2): 432-8
75. Lees-Miller JP, Henry G, Helfman DM (1992) Identification of act2, an essential gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that encodes a protein related to actin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 80-3
76. Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 746-85
77. Lee WL, Bezanilla M, Pollard TD (2000) Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *J Cell Biol.* 151: 789-800
78. Leupold U (1950) Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *CR Trav Lab Carlsberg Ser Physiol* 24:381-480
79. Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999) Phylogenetic Relationships Among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16:1799-1808
80. Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GG (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-49

81. Lorek J, Pöggeler S, Weide MR, Breves R, Bockmühl DP. Influence of farnesol on the morphogenesis of *Aspergillus niger*. J Basic Microbiol. 48: 99-103
82. Madhani HD, Fink GR (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. Trends in Cell Biol. 8: 348-35
83. Madrid M, Soto T, Khong HK, Franco A, Vicente J, Pérez P, Gacto M, Cansado J (2006) Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. J Biol Chem. 281: 2033-43
84. Maresca B, Kobayashi GS (1989) Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiol Rev. 53 (2): 186-209
85. Marks J, Hyams JS (1985) Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. Eur J Cell Biol 39: 27-32.
86. Marks J, Hagan IM, Hyams JS (1986) Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: The role of the cytoskeleton. J Cell Sci Suppl 5: 229-41
87. Martín-Cuadrado AB, Dueñas E, Sipiczki M, Vázquez de Aldana CR, 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: 1689-98
88. Martínez-Espinoza AD, León C, Elizarraraz G, Ruiz-Herrera J (1997) Monomorphic Nonpathogenic Mutants of *Ustilago maydis*. Phytopathology. 87 (3): 259-65
89. Maundrell K (1993) Thiamine-repressible expression vectors prep and prip for fission yeast. Gene. 123:127-130



90. McIntyre M, Dynesen J, Nielsen J (2001) Morphological characterization of *Aspergillus nidulans*: growth, septation and fragmentation. *Microbiology*. 147: 239-46
91. McCullough MJ, Clemons KV, McCusker HJ, Stevens DA (1998) Intergenic Transcribed Spacer PCR Ribotyping for Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1035-1038
92. Medoff J, Jacobson E, Medoff G (1981) Regulation of dimorphism in *Histoplasma capsulatum* by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J Bacteriol.* 145: 1452-5
93. Miklos I, Szilagyi Z, Watt S, Zilahi E, Batta G, Antunovics Z, Enczi K, Bähler J, Sipiczki M (2008) 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
94. Mitchison JM, Creanor J (1971) Further measurements of DNA synthesis and enzyme potential during cell cycle of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res.* 69: 244-7
95. Mitchinson JM, Nurse P (1985) Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 75: 357-76
96. Mochida S, Yanagida M (2006) Distinct modes of DNA damage response in *S. pombe* G0 and vegetative cells. *Genes Cells.* 11: 13-27
97. Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, Sánchez-Pérez M, Nombela C (1998) *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol.* 1: 95-106
98. Monge RA, Román E, Nombela C, Pla J (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology.* 152 (Pt 4): 905-12

99. Morín M, Monteoliva L, Insenser M, Gil C, Domínguez A (2007) Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. *J Mass Spectrom.* 42 (11): 1453-62
100. Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AL, Nickerson KW (2005) Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl Environ Microbiol.* 71: 4938-40
101. Mulvihill DP, Pollard PJ, Win TZ, Hyams JS (2001) Myosin V-mediated vacuole distribution and fusion in fission yeast. *Curr Biol.* 11 (14): 1124-7
102. Nakase Y, Fukuda K, Chikashige Y, Tsutsumi C, Morita D, Kawamoto S, Ohnuki M, Hiraoka Y, Matsumoto T. (2006) A defect in protein farnesylation suppresses a loss of *Schizosaccharomyces pombe* tsc2+, a homolog of the human gene predisposing to tuberous sclerosis complex. *Genetics.* 173: 569-78
103. Nedergaard M, Desai S, Pulsinelli W (1990) Dicarboxy-dichlorofluorescein: a new fluorescent probe for measuring acidic intracellular pH. *Anal Biochem.* 187: 109-14
104. Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM (2006) Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol.* 72: 3805-13
105. Noverr MC, Huffnagle GB (2004) Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infect Immun.* 72: 6206-10
106. Odds FC (1985) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol.* 12: 45-93
107. Odds FC (1994) Pathogenesis of *Candida* infections. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31: S2-S5.
108. Orłowski M (1991) *Mucor* dimorphism, *Microbiol Rev.* 55: 234-58

109. Page RD (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* 12: 357-358
110. Pan X, Harashima T, Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol.* 3: 567-72
111. Pan X, Heitman J (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19: 4874-87
112. Peñalva MA (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* 42: 963-75
113. Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ, Gygi SP (2003) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res.* 2: 43-50
114. Pérez-Campo FM, Domínguez A. (2001) Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol.* 43: 429-33
115. Reiter W, Watt S, Dawson K, Lawrence CL, Bähler J, Jones N, Wilkinson CR (2008) Fission yeast MAP kinase Sty1 is recruited to stress-induced genes. *J Biol Chem.* 283: 9945-56
116. Ribas JC, Diaz M, Duran A, Perez P (1991) Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3)beta-D-glucan. *J Bacteriol.* 173: 3456–3462
117. Roberts CJ, Raymond CK, Yamashiro CT, Stevens TH (1991) Methods for studying the yeast vacuole. *Meth. Enzymol.* 194: 644-661

118. Ruiz-Herrera J, Leon CG, Guevara-Olvera L, Cabarez-Trejo A (1995) Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiol.* 141: 695-703
119. Rustici G, Mata J, Kivinen K, Lió P, Penkett CJ, Burns G, Hayles J, Brazma A, Nurse P, Bähler J. (2004) Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet.* 36: 809-17
120. Sajiki K, Hatanaka M, Nakamura T, Takeda K, Shimanuki M, Yoshida T, Hanyu Y, Hayashi T, Nakaseko Y, Yanagida M (2009) Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*. *J Cell Sci.* 122: 1418-29
121. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
122. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell* 2 (5): 1053-1060
123. Scherr GH, Weaver RH (1953) The dimorphism phenomenon in yeasts. *Bacteriol Rev.* 17 (1): 51-92
124. Schmidt MW, Houseman A, Ivanov AR, Wolf DA (2007) Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Syst Biol.* 3: 79
125. Shepherd MG, Yin CY, Ram SP, Sullivan PA (1980) Germ tube induction in *Candida albicans*. *Can J Microbiol.* 26 (1): 21-6
126. Shoji JY, Arioka M, Kitamoto K (2006) Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell.* 5: 411-21

127. Singh G, Klar AJ (2002) The 2.1-kb inverted repeat DNA sequences flank the mat2,3 silent region in two species of *Schizosaccharomyces* and are involved in epigenetic silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 162: 591-602
128. Smith CL, Matsumoto T, Niwa O, Klco S, Fan JB, Yanagida M, Cantor CR (1987) An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 15: 4481-9
129. Sipiczki M, Ferenczy L (1977) Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating type. *Molec. gen. Genet*. 151: 77-81
130. Sipiczki M, Grallert B, Miklos I (1993) Mycelial and syncytial growth in *Schizosaccharomyces pombe* induced by novel septation mutations. *J Cell Sci*. 104: 485-93
131. Sipiczki M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S, Miklos I (1998a) Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology* 144: 1319-1330
132. Sipiczki M, Takeo K, Grallert A (1998b) Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology* 144: 3475-3485
133. Sipiczki M (2000a) Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol*. 1: 1011.1-1001.4
134. Sipiczki M, Yamaguchi M, Grallert A, Takeo K, Zilahi E, Bozsik A, Miklos I (2000b) Role of cell shape in determination of the division plane in *Schizosaccharomyces pombe*: random orientation of septa in spherical cells. *J Bacteriol*. 182: 1693-701
135. Sipiczki M (2007) Splitting of the fission yeast septum. *FEMS Yeast Res*. 7: 761-70

136. Sirotkin V, Beltzner CC, Marchand JB, Pollard TD (2005) Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J Cell Biol.* 170: 637-48
137. Steinberg G, Schliwa M, Lehmler C, Bölker M, Kahmann R, McIntosh JR (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci.* 111: 2235-46
138. Steinberg G (2007) On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 5: 309-16
139. Stevens DA (1995) Coccidioidomycosis. *N Engl J Med.* 332: 1077-82
140. Streiblová E, Hasek J, Jelke E (1984) Septum pattern in ts mutants of *Schizosaccharomyces pombe* defective in genes *cdc3*, *cdc4*, *cdc8* and *cdc12*. *J Cell Sci.* 69: 47-65
141. Su SS, Tanaka Y, Samejima I, Tanaka K, Yanagida M (1996) A nitrogen starvation-induced dormant G0 state in fission yeast: the establishment from uncommitted G1 state and its delay for return to proliferation. *J Cell Sci.* 109: 1347-57
142. Sudbery P, Gow N, Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 12: 317-24
143. Sun N, Jang J, Lee S, Kim S, Lee S, Hoe KL, Chung KS, Kim DU, Yoo HS, Won M, Song KB (2005) The first two-dimensional reference map of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* proteins. *Proteomics.* 5: 1574-9
144. Swennen D, Beckerich JM. (2007) *Yarrowia lipolytica* vesicle-mediated protein transport pathways. *BMC Evol Biol.* 7: 219
145. Szabo R (1999) Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiol (Praha).* 44: 19-24

146. Szilagyi Z, Grallert A, Nemeth N, Sipiczki M (2002) The *Schizosaccharomyces pombe* genes sep10 and sep11 encode putative general transcriptional regulators involved in multiple cellular processes. *Mol Genet Genomics*. 268: 553-62
147. Takegawa K, Iwaki T, Fujita Y, Morita T, Hosomi A, Tanaka N (2003) Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Struct Funct*. 28: 399-417
148. Umeyama T, Kaneko A, Watanabe H, Hirai A, Uehara Y, Niimi M, Azuma M (2006) Deletion of the CaBIG1 gene reduces beta-1,6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in *Candida albicans*. *Infect Immun*. 74: 2373-81
149. Yanagida (2002) The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol*. 3: COMMENT2003.
150. Yukawa M, Maki T (1931) Regarding the new fission yeast *Schizosaccharomyces Japonicus*. *Kyushu Daigaku Kiyou* (Japanese) 218-226
151. van der Valt JP, Yarrow D (1984) Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: Kreger-van Rij NJW (ed) *The yeasts. A taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, pp: 415-418
152. Van Dyke N, Baby J, Van Dyke MW (2006) Stm1p, a ribosome-associated protein, is important for protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under nutritional stress conditions. *J Mol Biol*. 358: 1023-31
153. van Slegtenhorst M, Carr E, Stoyanova R, Kruger WD, Henske EP (2004) Tsc1+ and tsc2+ regulate arginine uptake and metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 279: 12706-13

154. Vandersall AS, Cameron RG, Nairn CJ, Yelenosky G, Wodzinski RJ (1995) Identification, characterization, and partial purification of glucoamylase from *Aspergillus niger* (syn *A. ficuum*). *Prep Biochem.* 25: 29-55
155. Vida TA, Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol.* 128: 779-92
156. Walther A, Wendland J (2004) Polarized hyphal growth in *Candida albicans* requires the Wiskott-Aldrich Syndrome protein homolog Wallp. *Eukaryot Cell.* 3: 471-82
157. Weig M, Gross U, Muhlschlegel F (1998) Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. *Trends Microbiol.* 6: 468-470
158. Weisman R, Roitburg I, Schonbrun M, Harari R, Kupiec M (2007) Opposite effects of tor1 and tor2 on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics.* 175: 1153-62
159. Willer T, Brandl M, Sipiczki M, Strahl S (2005) Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol.* 57: 156-70
160. Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, Winzer K, Middleton B, Pritchard DI, Bycroft BW (2000) Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355: 667-80
161. Withers H, Swift S, Williams P (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 4: 186-93
162. Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA és mtsi (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* 415: 871-80



## 11. Függelék

### 11.1. Mellékletek

#### 1. táblázat A $myc^{-}$ mutánsok keresztezési mátrixa

-: rekombináns, azaz vad típusú utódot nem adó keresztezés; +: rekombináns, azaz vad típusú  $myc^{+}$  utódot adó keresztezés; **0**: azonos törzsek.

**R**: rekombináns, eltérő markerrel rendelkező törzs (7-182, 7-191); **?**: el nem végzett párosítások; <sup>1</sup> a számok a törzsek törzskönyvi számának rövidítései, például a 148-as szám 7-148-as törzset jelenti. Az ura, ade, leu, liz, arg megjelölések a törzsek auxotróf markereire utalnak.

	63 leu 182 ade	148 ura	154 arg 191 ade	155 leu	156 leu	157 ura	159 liz	163 arg	176 arg
63 <sup>1</sup> (182)	0	+	+	+	R-	-	+	+	+
148	+	0	+	+	+	+	+	+	+
154(191)	+	+	0	+	+	+	+	?	R+
155	+	+	+	0	+	+	+	+	+
156	R-	+	+	+	0	-	+	+	+
157	-	+	+	+	-	0	+	+	+
159	+	+	+	+	+	+	0	+	+
163	+	+	?	+	+	+	+	0	?
176	+	+	R+	+	+	+	+	?	0

## 2.táblázat A keresztezések oktádanalízise

<sup>1</sup> A számok a törzsek törzskönyvi számának rövidítései. Például a 148-as szám 7-148-as törzset jelenti. <sup>2</sup> Az oktádok között voltak olyanok, amelyeknél a 8 spórából nem mindegyik képzett telepet

Keresztezés <sup>1</sup>	Oktádok száma		Spóra- életképesség %	Vad típusú (myc <sup>+</sup> ) rekombinánsok %	Marker rekombináció %
	Összes	Teljes <sup>2</sup>			
148x154	22	5	72,4	10,8	8,6
148x155	11	3	67,8	18,6	30,5
148x156	5	0	67,5	33,3	35,7
148x159	6	0	60,0	25,9	33,3
148x163	8	1	76,3	28,9	6,7
148x176	16	1	61,2	30,0	6,7
154x63	5	2	85,0	17,6	55,6
154x155	14	4	88,0	10,5	32,6
154x156	10	0	68,4	13,5	34,6
154x157	13	9	97,0	22,7	2,1
154x159	9	0	63,2	53,5	41,9
155x157	9	3	81,2	26,7	32,1
155x159	9	0	58,3	35,4	22,9
155x163	14	2	76,1	16,9	38,6
155x176	13	1	70,3	15,5	46,7
156x157	6	1	83,3	0	22,5
156x159	5	0	57,5	34,8	56,5
156x163	5	0	60,0	24,0	16,0
156x176	5	0	67,5	7,4	22,2
156x182	9	0	76,4	0	0
157x63	8	0	73,0	0	21,7
157x159	8	2	76,6	30,6	22,4
157x163	15	5	90,4	38,5	15,2
157x176	10	2	84,6	13,6	0

Keresztezés <sup>1</sup>	Oktádok száma		Spóra- életképesség %	Vad típusú (myc <sup>+</sup> ) rekombinánsok %	Marker rekombináció %
	Összes	Teljes <sup>2</sup>			
159x63	18	0	68,6	26,8	29,6
159x163	16	1	60,8	40,8	23,7
159x176	12	3	68,1	33,9	59,7
159x96	17	2	66,9	33,8	39,5
163x63	19	4	74,7	7,6	31,4
176x63	23	0	52,1	28,6	56,1
176x191	18	3	78,5	28,3	13,3

**4. táblázat** A *S. japonicus* vad és mutáns törzseinek  $\beta$ -glükanáz érzékenysége a kezelési idő függvényében.

+: a kezelés előtti állapotot mutató sejtek (0-nak tekintendő)

törzs	sejtek szétesése (%)					
	10 perc	20 perc	50 perc	70 perc	90 perc	2óra 50perc
kontrol törzs						
7-1	+	+	1-5	10	20	40
sep-szerű mutánsok						
7-63	+	+	10	20-30	50	70-80
7-96	+	+	10	10	20-30	80
7-156	+	+	10	10-20	20	60
7-159	+	+	1-10	10	10-20	40-50
7-163	+	+	10	20	20-30	80
kerek mutánsok						
7-148	+	+	20	20-30	30-40	80-90
7-154	+	+	1-10	10	10	60
7-155	+	+	1-10	10	20	70
7-157	+	+	10	30-40	50	90
sep-szerű és kerek mutánsok						
7-176	50	60	70	90	99	100

**5. táblázat** *S. japonicus* vad, sep-szerű és kerek mutáns törzseinek kálium-klorid érzékenysége („h+”-al jelöltük a 7-1-es törzs micélium-képzését)

<b>KCl</b> koncentráció	kontrol (YEA)	0,3M	0,6M	0,9M
kontrol törzs				
7-1	+++ /h+	+++ /h+	++ /h+	+/h-
sep-szerű mutánsok				
7-63	+++	+++	1,5+	+
7-156	+++	+++	++	+
7-159	++	1,5+	+	0,5+
7-163	+++	+++	1,5+	+
kerek és rövid sejtes mutánsok				
7-148	+++	+++	++	+
7-154	++	++	1,5+	+
7-155	+++	+++	1,5+	+
7-157	++	++	++	+
sep-szerű és kerek mutáns				
7-176	++	++	+	+

**6. táblázat:** *S. japonicus* vad, sep-szerű és kerek mutáns törzseinek nátrium-klorid érzékenysége („h+”-al jelöltük a 7-1-es törzs micélium-képzését)

<b>NaCl</b> koncentráció	kontrol (YEA)	0,3M	0,6M
kontrol törzs			
7-1	+++/h-	++/h-	+/h-
sep-szerű mutánsok			
7-63	+++	+	0,5+
7-156	+++	+++	1,5+
7-159	++	-	-
7-163	+++	1,5+	0,5+
kerek és rövid sejtes mutánsok			
7-148	+++	+++	++
7-154	++	++	-
7-155	+++	++	0,5+
7-157	++	++	0,5+
sep-szerű és kerek mutáns			
7-176	++	+	-

**7. táblázat:** *S. japonicus* vad, sep-szerű és kerek mutáns törzseinek kalcium-klorid érzékenysége („h+”-al jelöltük a 7-1-es törzs micélium-képzését)

CaCl <sub>2</sub> koncentráció	kontrol (YEA)	0,1M	0,2M	0,6M
kontrol törzs				
7-1	+++/h+	+++/h-	++/h-	-
sep-szerű mutánsok				
7-63	+++	++	+	-
7-156	+++	+++	++	-
7-159	++	+	-	-
7-163	+++	+++	+	-
kerek és rövid sejtes mutánsok				
7-148	+++	++	+	-
7-154	++	1,5+	+	-
7-155	+++	++	1,5+	-
7-157	++	++	+	-
sep-szerű és kerek mutáns				
7-176	++	+	-	-

**8. táblázat:** *S. japonicus* vad, sep-szerű és kerek mutáns törzseinek magnézium-klorid érzékenysége („h+”-al jelöltük a 7-1-es törzs micélium-képzését)

MgCl <sub>2</sub> koncentráció	kontrol (YEA)	0,3 M	0,6 M
kontrol			
7-1	+++/h+	+++/h+	+++/h+
sep-szerű mutánsok			
7-63	+++	2,5+	++
7-156	+++	2,5+	++
7-159	++	-	-
7-163	+++	2,5+	++
kerek és rövid sejtes mutánsok			
7-148	+++	2,5+	2,5+
7-154	++	++	1,5+
7-155	+++	2,5+	++
7-157	++	++	1,5+
sep-szerű és kerek mutáns			
7-176	++	++	+

**9. táblázat:** *S. japonicus* vad, sep-szerű és kerek mutáns törzseinek ozmotikus érzékenysége („h+”-al jelöltük a 7-1-es törzs micélium-képzését)

szorbit	kontrol (YEA)	0,9 M	1,2 M	1,8 M
kontrol				
7-1	+++/h+	++/h+	++/h+	+/h-
sep-szerű mutánsok				
7-63	+++	++	1,5+	0,5+
7-156	+++	++	+	0,5+
7-159	++	+	+	0,25
7-163	+++	++	+	0,5+
kerek és rövid sejtes mutánsok				
7-148	+++	++	++	0,5+
7-154	++	1,5+	1,5+	+
7-155	+++	++	++	+
7-157	++	1,5+	+	0,5+
sep-szerű és kerek mutáns				
7-176	++	+	0,5+	0,5+

**10. táblázat** *S. japonicus* vad és mutáns törzseinek növekedése 25, 30 és 37°C-on („h+”-al jelöltük a 7-1-es törzs micélium-képzését)

hőmérséklet	25°C	30°C	37°C
kontrol törzs			
7-1	2,5+/h+	+++/h+	2,5+/h+
sep-szerű mutánsok			
7-63	+++	+++	++
7-156	++	+++	0,5+
7-159	1,5+	++	1,5+
7-163	+++	+++	+
kerek és rövid sejtes mutánsok			
7-148	+++	+++	++
7-154	++	++	++
7-155	1,5+	++	1,5+
7-157	++	++	+
sep-szerű és kerek mutáns			
7-176	++	++	0,5+

**3. táblázat:** A *S. japonicus* myc<sup>-</sup> mutáns törzsek jellegzetességeinek összefoglalása

e: exponenciális fázisú tenyészet, s: stacioner fázisú tenyészet

<sup>1</sup> A számok a törzsek törzskönyvi számának rövidítései. Például a 148-as szám 7-148-as törzset jelenti.

<sup>2</sup> +: spóráztató táptalajon spórázó tenyészet, -: spóráztató táptalajon nem spórázó tenyészet

Törzs <sup>1</sup>	Allél	sejtalak		Szeptum	Aktin eloszlás	Vakuólum morfológia	Spórázás <sup>2</sup>
		24 órás tenyészet YEL-ben	6-10 napos tenyészet YEA-n				
7-1	Vad típus	megnyúlt, hosszúkás sejtek	megnyúlt élesztő sejtek és rövid hifák	Párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	e: közepes méretű s: óriás méretű, poláris	+
7-63	myc-4	sep-szerű	rövid és kerek	Párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	e: közepes méretű s: sok kisméretű ill. egy nagyméretű a nagyobb sejtekben	+
7-96	myc-10	kissé sep-szerű	kerek	Párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	e: közepes méretű s: sok kisméretű ill. egy nagyméretű a nagyobb sejtekben	+
7-148	myc-31	rövid és kerek	kerek	Párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	e: közepes méretű s: sok kisméretű ill. egy nagyméretű a nagyobb sejtekben	+
7-154	myc-34	kerek	kerek	Nem párhuzamos az előző szeptummal	Apoláris	Nagyon kicsi	-



Törzs <sup>1</sup>	Allél	sejtalak		Szeptum	Aktin eloszlás	Vakuólum morfológia	Spórázás
		24 órás tenyészet YEL-ben	6-10 napos tenyészet YEA-n				
7-1	Vad típus	megnyúlt, hosszúkás sejtek	megnyúlt élesztő sejtek és rövid hifák	Párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	e: közepes méretű s: óriás méretű, poláris	+
7-155	myc-35	kerek	kerek	Nem párhuzamos az előző szeptummal	Apoláris	Nagyon kicsi	-
7-156	myc-36	kissé sep-szerű	kerek és hosszúkás	Párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	Nagyon kicsi	+
7-157	myc-37	kerek és hosszúkás	kerek és hosszúkás	Előfordul, hogy nem párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	Nagyon kicsi	+
7-159	myc-39	sep-szerű	rövid	Párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	Néhány többnyire kisméretű	+
7-163	myc-43	sep-szerű és hosszúkás	kerek és hosszúkás	Párhuzamos az előző szeptummal	Bipoláris a növekedő sejtekben, az osztódó sejtekben mediális	Óriás	+
7-176	myc-56	kerek együtt maradó sejtek (sep-szerű)	kerek	Nem párhuzamos az előző szeptummal	Apoláris	Nagyon kicsi	-

**Melléklet 11. táblázat** Az élesztősejtes és micéliális mintákból LC-MS/MS-sel azonosított *S. pombe* fehérjék csoportosítása funkció szerint (i: megtalálható, n: nem megtalálható)

\*A funkcióra vonatkozó adatokat a <http://www.genedb.org/genedb/pombe/> helyen található adatbázisban találtuk meg.

"Azonosító"	Gén	Fehérje	hifa	sejt	Funkció*
		<b>Metabolizmus</b>			
		<b>glikolízis és glükoneogenezis</b>			
SPBC14F5.04c	pgk1	foszfoglicerát kináz	i	i	glikolízis
SPBC32F12.11	tdh1	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz	i	i	glikolízis
SPBC354.12	gpd3	glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz	i	i	glikolízis
SPBC16H5.02	pfk1	6-foszfofruktokináz	i	i	glikolízis
SPCC13B11.01	adh1	alkohol dehidrogenáz	i	i	glikolízis, etanol bioszintézis
SPAC9E9.09c		alkohol dehidrogenáz	n	i	glikolízis, etanol bioszintézis
SPAC26F1.06	gpm1	monomer 2,3- biszfoszfoglicerát	i	i	glikolízis, glükoneogenezis
SPAC4H3.10c	pyk1	piroszőlősav kináz	i	i	glikolízis
SPCC24B10.21	tpi1	triózfoszfát izomeráz	i	i	glikolízis
SPBC1815.01	eno101	enoláz	i	i	glikolízis
SPBPB21E7.01c	eno1	Enoláz	i	i	glikolízis
SPAC4F8.07c	hvk2	hexokiáz 2	i	i	glikolízis
SPBC19C2.07	fba1	fruktóz-biszfoszfát aldoláz	i	i	glikolízis
SPBC1604.05	pgi1	glükóz-6-foszfát izomeráz	i	i	glikolízis
SPBC17G9.11c	pyr1	piroszőlősav karboxiláz	n	i	glükoneogenezis

"Azonosító"	Gén	Fehérje	hifa	sejt	Funkció*
SPCC794.07		dihidrolipoamid S-acetiltransferáz	n	i	glikolízis
SPBC32F12.10		Foszfoglükomutáz	n	i	glikolízis
		<b>citromsav ciklus</b>			
SPAC24C9.06c		akonitát hidratáz	i	i	citromsav ciklus
SPBC3H7.03c		2-oxoglutarát dehidrogenáz	i	i	citromsav ciklus
SPCC306.08c		malát dehidrogenáz	i	i	citromsav ciklus, malát metabolizmus
SPBC902.05c	idh2	izocitrát dehidrogenáz	i	i	citromsav ciklus
SPAC6C3.04	cit1	citrát szintetáz	i	n	citromsav ciklus
SPAC6G10.08	idp1	izocitrát dehidrogenáz	n	i	citromsav ciklus
SPAC11G7.03	idh1	izocitrát dehidrogenáz	n	i	citromsav ciklus
SPAC1556.02c	sdh1	szukcinát dehidrogenáz	n	i	citromsav ciklus
		<b>pentóz foszfát ciklus</b>			
SPCC1020.06c	tal1	transzaldoláz	i	i	pentóz-foszfát útvonal
SPBC2G5.05		transzketoláz	i	i	pentóz-foszfát útvonal
SPBC660.16		foszfoglükonát dehidrogenáz	n	i	pentóz-foszfát útvonal
		<b>légzés és fermentáció</b>			
SPAC14C4.14	atp1	F1-ATPáz alfa alegység	i	i	mitokondriális ATP szintézis és proton transzport
SPAC222.12c	atp2	F1-ATPáz béta alegység	i	i	mitokondriális ATP szintézis és proton transzport
SPBC16C6.08c	qcr6	ubikinol-citokrom C reduktáz komplex 8-as alegység	i	i	mitokondriális elektron transzport

"Azonosító"	Gén	Fehérje	hifa	sejt	Funkció*
SPCC737.02c	qcr7	ubikinol-citokróom C redukáz komplex 6-os alegység	i	i	mitokondriális elektron transzport
SPBC1604.07	atp4	F0-ATPáz alegység	i	i	mitokondriális ATP szintézis, proton transzport
SPBC530.10c	anc1	adenin nukleotid szállító	i	i	mitokondriális transzport
SPCC613.10	qcr2	ubikinol-citokróom C redukáz komplex központi protein	i	n	mitokondriális elektron transzport
SPCC338.10c	cox5	citokróom C oxidáz V alegysége	i	n	mitokondriális elektron transzport
SPCC191.07	cyc1	citokróom C	i	n	mitokondriális elektron transzport
SPBC947.15c		NADH dehidrogenáz	n	i	mitokondriális elektron transzport
		<b>Protein szintézis</b>			
SPCP31B10.07	eft202	transzlációs elongációs faktor 2	i	i	protein szintézis
SPAC513.01c	eft201	transzlációs elongációs faktor 2	i	i	protein szintézis
SPCC417.08	tef3	transzlációs elongációs faktor 3	i	i	protein szintézis
SPCC794.09c	ef1a-a	transzlációs elongációs faktor EF-1 alfa	i	i	protein szintézis
SPAC23A1.10	ef1a-b	transzlációs elongációs faktor EF-1 alfa	i	i	protein szintézis
SPBC839.15c	ef1a-c	transzlációs elongációs faktor EF-1 alfa	i	i	protein szintézis
SPAC1006.07		transzlációs iniciációs faktor eIF4A	n	i	transzláció iniciáció
SPAC26A3.07c	rpl1101	60S riboszómális fehérje L11	i	i	transzláció
SPBC17G9.10	rpl1102	60S riboszómális fehérje L11	i	i	transzláció
SPBP8B7.03c	rpl402	60S riboszómális fehérje L2	i	i	transzláció

<b>"Azonosító"</b>	<b>Gén</b>	<b>Fehérje</b>	<b>hifa</b>	<b>sejt</b>	<b>Funkció*</b>
SPBC1711.06	rpl401	60S riboszómális fehérje L2	i	i	transzláció
SPBC16D10.11c	rps1801	40S riboszómális fehérje S18	n	i	transzláció
SPCC1259.01c	rps1802	40S riboszómális fehérje S18	n	i	transzláció
SPBC685.07c	rpl2701	60S riboszómális fehérje L27	n	i	transzláció
SPBC29A3.04	rpl8	60S riboszómális fehérje L7	n	i	transzláció
SPAC1F7.13c	rpl801	60S riboszómális fehérje L2A	n	i	transzláció
SPBC2F12.07c	rpl802	60S riboszómális fehérje L8	n	i	transzláció
SPBC839.04	rpl803	60S riboszómális fehérje L8	n	i	transzláció
SPAC26A3.04	rpl2002	60S riboszómális fehérje L20	n	i	transzláció
SPAC3A12.10	rpl2001	60S riboszómális fehérje L20a	n	i	transzláció
SPAC13G6.02c	rps101	40S riboszómális fehérje S3a	n	i	transzláció
SPBC11C11.07	rpl1801	60S riboszómális fehérje L18	n	i	transzláció
SPBC29A3.12	rps902	40S riboszómális fehérje S9	n	i	transzláció
SPBC19F8.08	rps401	40S riboszómális fehérje S4	n	i	transzláció
SPAC959.07	rps403	40S riboszómális fehérje S4	n	i	transzláció
SPAPB8E5.06c	rpl302	60S riboszómális fehérje L3	n	i	transzláció
SPAC17A5.03	rpl301	60S riboszómális fehérje L3	n	i	transzláció
SPCC24B10.09	rps1702	40S riboszómális fehérje S17	n	i	transzláció
SPBC839.05c	rps1701	40S riboszómális fehérje S17	n	i	transzláció
SPAC13G6.07c	rps601	40S riboszómális fehérje S6	n	i	transzláció
SPAPB1E7.12	rps602	40S riboszómális fehérje S6	n	i	transzláció
SPAC18G6.14c	rps7	40S riboszómális fehérje S7	n	i	transzláció

"Azonosító"	Gén	Fehérje	hifa	sejt	Funkció*
SPBC29B5.03c	rpl26	60S riboszómális fehérje L26	n	i	transzláció
SPBC106.18	rpl2501	60S riboszómális fehérje L25	n	i	transzláció
SPAC328.10c	rps502	40S riboszómális fehérje S5	n	i	transzláció
SPAC8C9.08	rps5	40S riboszómális fehérje S5	n	i	transzláció
SPAC22H12.04c	rps102	40S riboszómális fehérje S3a	n	i	transzláció
SPAC11E3.15	rpl22	60S riboszómális fehérje L22	n	i	transzláció
SPBC18H10.13	rps1402	40S riboszómális fehérje S14S	n	i	transzláció
		<b>egyéb metabolizmus</b>			
SPAC1F8.07c		piroszőlősav dekarboxiláz	i	i	etanolos fermentáció, aminosav metabolizmus, piroszőlősav metabolizmus
SPAC3G9.11c		piroszőlősav dekarboxiláz	i	i	etanolos fermentáció, aminosav metabolizmus, piroszőlősav metabolizmus
SPAC13A11.06		piroszőlősav dekarboxiláz	n	i	etanolos fermentáció, aminosav metabolizmus, piroszőlősav metabolizmus
SPAC9.09	met26	homocisztein metiltranszferáz	i	i	aminosav bioszintézis
SPBC56F2.12	ilv5	acetonhidroxisav reduktoizomeráz	i	i	aminosav bioszintézis
SPCC70.03c		prolin dehidrogenáz	i	i	aminosav bioszintézis
SPAC750.08c		NAD-függő malát enzim	i	n	aminosav, malát, piruvát metabolizmus
SPBC215.08c	arg4	karbamoil-foszfát szintáz	i	i	aminosav bioszintézis
SPAC24C9.12c		glicin hidroximetiltranszferáz	n	i	aminosav metabolizmus
SPAC4G9.09c	arg11	acetilglutamát kináz	n	i	aminosav bioszintézis

"Azonosító"	Gén	Fehérje	hifa	sejt	Funkció*
SPCC1223.02	nmt1	no message in thiamine Nmt1	i	i	vitamin bioszintézis
SPAC29B12.04	snz1	piridoxin bioszintézis protein	i	i	vitamin bioszintézis
SPCC1450.13c		riboflavin szintetáz	i	i	vitamin bioszintézis
SPAC9E9.11	plr1	piridoxál-reduktáz	i	n	vitamin bioszintézis, stressz válasz
SPAPB24D3.10c	agl1	alfa-glükozidáz	i	n	oligosaccharid, polisaccharid metabolizmus
SPAC869.04		formamidáz-szerű protein	n	i	nitrogén metabolizmus
SPACUNK4.10		2- hidroxisav dehidrogenáz	i	i	metabolizmus, oxidoreduktáz aktivitás
SPCC794.12c	mae2	malát enzim	i	i	malát, piruvát metabolizmus
SPAC22A12.11	dak1	dihidroxiaceton kináz	i	i	glicerin metabolizmus
SPBC1685.05		szerin proteáz	n	i	proteolízis, protein katabolizmus
SPAC3H5.05c	rps1401	40S riboszómális fehérje S14S	n	i	transzláció
		<b>Stressz</b>			
		<b>hősokk</b>			
SPCC1739.13	ssa2	hősokk protein 70 család	i	i	chaperone dajka
SPAC13G7.02c	ssa1	hősokk protein 70 család	i	i	chaperone
SPBC1709.05	sks2	hősokk protein 70 család	n	i	stressz, transzláció
SPAC110.04c	pss1	hősokk protein 70 család	i	i	stressz
SPAC664.11	ssc1	hősokk protein 70 család	i	i	stressz
SPAC926.04c	hsp90	hősokk protein	i	i	stressz, molekuláris chaperon
SPBC3E7.02c	hsp16	heat shock protein	n	i	stressz (hő), éhezés,

"Azonosító"	Gén	Fehérje	hifa	sejt	Funkció*
SPAC12G12.04	mcp60	hősokk protein 60	i	i	stressz, protein folding
SPBC16D10.08c		hősokk protein	i	i	stressz, protein folding
		<b>egyéb stressz</b>			
SPCC736.15		protein kináz inhibitor	i	i	stressz
SPAC19G12.09		NADPH-függő alfa-ketoamid reduktáz	i	i	stressz
SPAC10F6.06	vip1	rrm RNS felismerő motívum	i	i	stressz
SPBC215.05	gpd1	glicerin-3-foszfát dehidrogenáz	i	i	stressz válasz, ozmotikus stressz
SPBC365.12c	ish1	LEA domén protein	i	i	stressz
SPAC3A11.10c		membrán dipeptidáz	i	i	stressz
SPAC13F5.03c		glicerin dehidrogenáz	i	i	stressz, glicerin metabolizmus
SPCC330.06c		tioredoxin peroxidáz	i	i	stressz (oxidatív)
SPCC757.03c		konzervatív gomba protein	i	n	oxidatív stressz
SPBC16A3.02c		mitokondriális peptidáz	i	i	stressz válasz, mitokondriális fehérje feldolgozás
SPBC4F6.17c		AAA család ATPáz	i	i	stressz, protein folding
SPCC576.03c	tpx1	tioredoxin peroxidáz	n	i	stressz (oxidatív)
SPBC660.07	ntp1	alfa,alfa-trehaláz Ntp1	n	i	stressz, aszkospóra képzés
SPAC3C7.14c	obr1	ubiquitinated histone-like protein	n	i	stressz
SPAC22G7.11c SPAC4G8.01c		konzervatív gomba fehérje	n	i	stressz
SPBC16E9.16c		sequence orphan	i	i	stressz



"Azonosító"	Gén	Fehérje	hifa	sejt	Funkció*
SPAC23H3.15c SPAC25H1.01c		sequence orphan	i	i	stresszválasz oxidatív
SPAC32A11.02c		sequence orphan	n	i	stressz
		<b>Szabályozás</b>			
SPAC8E11.02c	rad24	14-3-3-protein	i	i	sejtciklus szabályozás
SPBC16A3.08c		nukleáris telomer sapka komplex alegység	i	n	TOR jelátviteli útvonal, telomer szerkezet fenntartása,
SPBC23G7.07c		replikáció szabályozó	i	n	replikáció szabályozás
SPAC1A6.04c	plb1	foszfolipáz B homológ	i	i	jelátvitel, stresszválasz, tápanyag érzékelés
SPAC1002.09c	dld1	dihidrolipoamid dehidrogenáz	n	i	sejtciklus szabályozás, aminosav metabolizmus
SPCC1795.11	sum3	ATP-függő RNS helikáz	n	i	szabályozás (sejtciklus)
SPAC1565.08	cdc48	AAA család ATP-áz	n	i	kromoszóma szegregáció, stressz, mitózis szabályozása
		<b>Szerkezet</b>			
SPBC28F2.03	ppi1	ciklofilin	i	i	protein folding, chaperon
SPAC22A12.15c	bip1	BiP	i	i	protein folding
SPBC25H2.05	ucp15	nascens polipeptid asszociált komplex	i	i	protein folding
SPBC32H8.12c	act1	aktin	i	i	aktin sejtváza, citokinézis,
SPBC1105.12	h4.3	histone H4	n	i	kromatin szerkezet biztosítása
SPAC1834.03c	hhf1	histone H4	n	i	kromatin szerkezet biztosítása

"Azonosító"	Gén	Fehérje	hifa	sejt	Funkció*
SPBC8D2.03c	hhf2	histone H4	n	i	kromatin szerkezet biztosítása
SPAC3C7.11c	cnx1	kalnexin	n	i	apoptózis, protein folding
		<b>Transzport</b>			
SPAC1635.01		feszültség függő anoin szelektív csatorna	i	i	ion transzport
SPBC31F10.06c	sar1	ADP-ribosilációs faktor	i	i	intracelluláris protein transzport
SPBC4F6.18c	arf1	ADP-ribosilációs faktor	i	n	intracelluláris protein transzport
SPAC57A7.04c	pabp	mRNA export protein	n	i	mRNS export
SPAC1071.10c	pma1	P-típusú proton ATPáz	n	i	proton transzport
SPAC1834.11c	sec18	szekrécións protein	n	i	intracelluláris protein transzport, valuolum fúzió
SPBC8D2.20c	sec31	COPII-bevont vezikulum alkotó	n	i	intracelluláris protein transzport
		<b>egyéb</b>			
SPAC869.06c		kation kötő protein	n	i	kation kötés
SPBC1198.01		glutation-függő formaldehid dehidrogenáz	n	i	oxidoreduktáz aktivitás