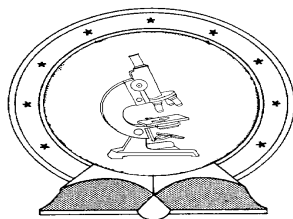


DE TTK



1949

**A *Schizosaccharomyces japonicus* sejtszeparációban résztvevő  
génjeinek vizsgálata**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

A szerző neve: Balázs Anita  
Témavezető neve: Dr. Sipiczki Mátyás

DEBRECENI EGYETEM  
Természettudományi Doktori Tanács  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2012.

Jelen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Kar Doktori Tanács, Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Biológia program keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktor (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2012. február 14.

Balázs Anita  
Doktorjelölt

Tanúsítom, hogy Balázs Anita doktorjelölt 2008-2010 között a fent megnevezett Doktori Iskola, Biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2012. február 14.

Dr. Sipiczki Mátyás  
Témavezető

# A *Schizosaccharomyces japonicus* sejtszeparációban résztvevő génjeinek vizsgálata

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

Írta: Balázs Anita okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája  
(Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Sipiczki Mátyás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Borbély György.....	.....
tagok:	Dr. Fehér Zsigmond.....	.....
	Dr. Gácsér Attila.....	.....

A doktori szigorlat időpontja: 2011. június 27.

Az értekezés bírálói:

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

A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének időpontja: 201... . . . . .

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés és célkitűzés .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>10</b>
2.1. A <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> általános jellemzése .....	10
2.2. A <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> egy dimorf élesztő .....	12
2.3. A dimorfizmus jelensége más gombafajokban .....	17
2.3.1. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i> korlátozottan képes a fonalas növekedésre .....	17
2.3.2. A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> képes pseudohifa képzésére .....	18
2.3.3. A <i>Candida albicans</i> dimorfizmusának szerepe lehet a patogénitásban .....	19
2.3.4. Egyéb gombafajok dimorfizmusa .....	20
2.4. A hasadó élesztők életciklusa .....	21
2.5. A <i>Sch. pombe</i> sejtciklusa .....	22
2.6. A <i>Sch. pombe</i> szeptumképzése és citokinézise .....	24
2.7. A <i>Sch. pombe</i> sejtszeparációjában részt vevő génjei .....	26
2.7.1. A Sep1p-Ace2p sejtszeparációs reguláló faktorok .....	26
2.7.2. A szeptum szerkezete és a sejtszeparáció enzimei .....	30
2.7.3. A sejtszeparációs enzimek szeptumhoz történő szállítása .....	31
<b>3. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>33</b>
3.1. A doktori munka során felhasznált törzsek .....	33
3.2. A doktori munka során felhasznált plazmidok .....	35
3.3. A doktori munka során használt primerek .....	40
3.4. Felhasznált oldatok és tápközegek .....	45
3.4.1. Tápoldatok <i>Sch. pombe</i> és <i>Sch. japonicus</i> számára .....	45
3.4.2. Tápközegekhez szükséges kiegészítő oldatok összetétele .....	47
3.4.3. <i>Escherichia coli</i> tenyésztéséhez használt tápoldatok .....	48
3.4.4. Kísérletekhez használt oldatok .....	48
3.5. Molekuláris biológiai módszerek .....	51
3.5.1. Genomiális DNS izolálás <i>Sch. japonicus</i> -ból üveggyöngyös módszerrel .....	51
3.5.2. Polimeráz láncreakció (PCR) .....	52
3.5.3. Gélelektroforézis .....	52
3.5.4. Restrikciós enzimes emésztés .....	53
3.5.5. Ligálás .....	53
3.5.6. Élesztő transzformálás elektroporátorral .....	54
3.5.7. <i>E. coli</i> transzformálás .....	54
3.5.8. Plazmid DNS izolálás <i>E. coli</i> sejtekből: Mini preparátum .....	54
3.5.9. RNS izolálás .....	55
3.5.10. RNS minta DN-áz kezelése .....	55
3.5.11. cDNS szintézis reverz transzkripcióval .....	56

3.5.12. Kvantitatív real time PCR .....	56
3.6. Genetikai módszerek .....	57
3.6.1. Plazmidvesztéses kísérlet .....	57
3.6.2. Törzsek keresztezése .....	57
3.7. Mikroszkópos vizsgálati módszerek .....	57
3.7.1. DAPI festés .....	58
3.7.2. Calcofluor festés.....	58
3.7.3. Sejtek és hifák morfológiai vizsgálata .....	58
3.7.4. Mikroszkópikus time-lapse (“folyamat-követéses”) analízis.....	59
3.8. Bioinformatikai módszerek .....	59
3.9. Egyéb módszerek .....	60
3.9.1. Vákuumcentrifugálás .....	60
3.9.2. Szedimentációs kísérlet .....	60
3.9.3. Sejtszámlálás .....	60
<b>4. Eredmények és megbeszélésük.....</b>	<b>61</b>
4.1. A <i>Sch. pombe</i> sejtszeparációs gének lehetséges ortológjainak azonosítása és szekvenciaelemzése a <i>Sch. japonicus</i> genom- szekvenciájában.....	61
4.1.1. A <i>Sch. pombe</i> sejtszeparációs génjeinek azonosítása a <i>Sch.</i> <i>japonicus</i> genom-szekvenciájában.....	61
4.1.2. A <i>Sch. japonicus</i> feltételezhető sejtszeparációs fehérjéinek szekvencia-elemzése .....	61
4.1.3. A <i>Sch. japonicus</i> sejtszeparációs génjeinek szekvenciaelemzése	64
4.1.3.1. Feltehetően Sep1 <sup>Sj</sup> transzkripció kötőhelyek a <i>Sch. japonicus</i> <i>ace2<sup>Sj</sup></i> génjében.....	65
4.1.3.2. Feltehetően az Ace2p <sup>Sj</sup> szabályozása alatt álló gének promóter régijának vizsgálata a <i>Sch. japonicus</i> -ban.....	66
4.1.3.2.1. A <i>Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup></i> promóterben található Ace2p <sup>Sj</sup> transzkripció kötőhelyek.....	66
4.1.3.2.2. A <i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> promóterben található Ace2p <sup>Sj</sup> transzkripció kötőhelyek.....	67
4.1.3.2.3. A <i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> promóterben található Ace2p <sup>Sj</sup> transzkripció kötőhelyek.....	67
4.2. A <i>Sch. pombe</i> sejtszeparációs gének ortológjainak inaktiválása a <i>Sch.</i> <i>japonicus</i> -ban .....	68
4.2.1. A <i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> és <i>eng1<sup>Sj</sup></i> gének inaktiválásának közös lépései.....	68
4.2.1.1. A <i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> génjének megszakítása .....	69
4.2.1.2. A <i>Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup></i> génjének megszakítása részleges delécióval .....	70
4.2.2. A <i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> génjének megszakítása részleges delécióval .....	72

4.2.3. A <i>Sch. japonicus</i> <i>agn1<sup>Sj</sup></i> és <i>mid2<sup>Sj</sup></i> gének inaktiválásának közös lépései.....	77
4.2.3.1. A <i>Sch. japonicus</i> <i>agn1<sup>Sj</sup></i> génjének deléciója.....	78
4.2.3.2. A <i>Sch. japonicus</i> <i>mid2<sup>Sj</sup></i> génjének deléciója.....	79
4.3. A mutánsok morfológiai vizsgálata.....	81
4.3.1. A mutánsok fenotípusa az élesztő-fázisban .....	81
4.3.1.1. Mikroszkópi morfológia.....	81
4.3.1.1.1. A <i>Sch. japonicus</i> <i>sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup></i> törzs morfológiai vizsgálata .....	81
4.3.1.1.2. A <i>Sch. japonicus</i> <i>ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup></i> törzs morfológiai vizsgálata.....	82
4.3.1.1.3. A <i>Sch. japonicus</i> <i>eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup></i> törzs morfológiai vizsgálata.....	84
4.3.1.1.4. A <i>Sch. japonicus</i> <i>agn1<sup>Sj</sup>Δ</i> törzs morfológiai vizsgálata ...	85
4.3.1.1.5. A <i>Sch. japonicus</i> <i>mid2<sup>Sj</sup>Δ</i> morfológiai vizsgálata .....	86
4.3.1.2. <i>Sch. japonicus</i> mutánsok szedimentációjának vizsgálata .....	88
4.3.2. A mutánsok fenotípusa a micéliumos fázisban .....	89
4.3.2.1. A <i>Sch. japonicus</i> <i>sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup></i> hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata .....	90
4.3.2.2. A <i>Sch. japonicus</i> <i>ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup></i> hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata .....	91
4.3.2.3. A <i>Sch. japonicus</i> <i>eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup></i> hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata .....	93
4.3.2.4. A <i>Sch. japonicus</i> <i>agn1<sup>Sj</sup>Δ</i> hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata .....	93
4.3.2.5. A <i>Sch. japonicus</i> <i>mid2<sup>Sj</sup>Δ</i> hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata .....	97
4.4. A <i>Sch. japonicus</i> gének funkcionális tesztelése a <i>Sch. pombe</i> -ben.....	98
4.4.1. Expressziós konstrukciók létrehozása.....	98
4.4.1.1. A <i>sep1<sup>Sj</sup></i> expressziós konstrukciók létrehozása .....	98
4.4.1.2. Az <i>ace2<sup>Sj</sup></i> expressziós konstrukciók létrehozása .....	98
4.4.1.3. Az <i>eng1<sup>Sj</sup></i> expressziós konstrukciók létrehozása.....	99
4.4.1.4. Az <i>agn1<sup>Sj</sup></i> expressziós konstrukciók létrehozása.....	99
4.4.2. <i>Sch. pombe</i> mutációk komplementálása <i>Sch. japonicus</i> géneket tartalmazó expressziós plazmidokkal.....	99
4.4.2.1. A <i>sep1<sup>Sj</sup></i> komplementáló hatásának vizsgálata.....	99
4.4.2.2. Az <i>ace2<sup>Sj</sup></i> komplementáló hatásának vizsgálata.....	101
4.4.2.3. Az <i>agn1<sup>Sj</sup></i> komplementáló hatásának vizsgálata .....	104
4.4.2.4. Az <i>eng1<sup>Sj</sup></i> komplementáló hatásának vizsgálata.....	107
4.5. A <i>Sch. japonicus</i> gének funkció-vizsgálata <i>Sch. japonicus</i> -ban .....	108
4.5.1. A <i>sep1<sup>Sj</sup></i> inaktiválásának hatása más sejtszeparációs gének működésére.....	108

4.5.2. Az <i>ace2<sup>Sj</sup></i> inaktiválásának hatása más sejtszeparációs gének működésére.....	109
4.5.3. Az <i>agn1<sup>Sj</sup></i> gén termékének sejten belüli lokalizációja.....	111
4.5.3.1. Konstrukció létrehozása GFP-vel jelölt Agn1p <sup>Sj</sup> fehérje képzésére .....	111
4.5.3.2. Az Agn1p <sup>Sj</sup> -GFP sejten belüli lokalizációja fluoreszcens mikroszkópiával .....	111
4.5.4. Az <i>eng1<sup>Sj</sup></i> gén termékének sejten belüli lokalizációja.....	112
4.5.4.1. Konstrukció létrehozása GFP-vel jelölt Eng1p <sup>Sj</sup> fehérje képzésére .....	112
4.5.4.2. Az Eng1p <sup>Sj</sup> -GFP sejten belüli lokalizációja fluoreszcens mikroszkópiával .....	113
4.5.5. A <i>mid2<sup>Sj</sup></i> gén termékének sejten belüli lokalizációja .....	113
4.5.5.1. Konstrukció létrehozása GFP-vel jelölt Mid2p <sup>Sj</sup> fehérje képzésére .....	113
4.5.5.2. A Mid2p <sup>Sj</sup> -GFP sejten belüli lokalizációja fluoreszcens mikroszkópiával .....	114
<b>5. Összefoglalás .....</b>	<b>115</b>
<b>6. További tervezett vizsgálatok.....</b>	<b>117</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>118</b>
<b>8. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>121</b>
<b>9. Irodalom .....</b>	<b>122</b>

## 1. Bevezetés és célkitűzés

Az élesztőgombák kutatása központi fontossággal rendelkezik a molekuláris biológia és sejtbiológia területén. Eukarióták révén génjeik sokszor homológiát mutatnak magasabbrendűek génjeivel, a humán génekkel is, így a rajtuk tanulmányozott és feltárt molekuláris mechanizmusok segíthetnek az emberi betegségek hátterének megértésében és terápiák kidolgozásában. Az elsőként szekvenált eukarióta genom élesztőé volt [*Saccharomyces cerevisiae*, Goffeau és mtsai, 1996.], amely megteremtette a genomika módszereinek elterjedését az eukarióták körében. A szintén az élesztők csoportjába tartozó *Schizosaccharomyces pombe*-nek szerepe van az eukarióta sejtciklus megismerésében, a rajta feltárt folyamatok konzervatívnak bizonyultak az élővilágban. Ennek jelentőségét bizonyítja a 2001-ben Paul M. Nurse-nek és Leland H. Hartwell-nek adományozott orvostudományi Nobel díj, amit a sejtciklus molekuláris mechanizmusainak feltárásáért illetve a *S. cerevisiae* és *Sch. pombe* sejtciklus gének (*cdc* gének) felfedezéséért kaptak. A humán *cdc2* cDNS képes komplementálni a homológ génben mutáns *Sch. pombe*-t [Lee and Nurse, 1987], amely lépés forradalmasította a sejtciklus kutatását.

A *Sch. pombe* sok szempontból kiváló modellorganizmusnak tekinthető, mert könnyen tenyészthető, egysejtű testszerveződésű, haploid genetikai állománnyal rendelkezik, ezért a benne létrehozott mutációk közvetlenül tanulmányozhatóak, és génjei számos vonatkozásban hasonlóbba bizonyultak az állati sejtek génjeihez, mint a *S. cerevisiae* élesztőtársáé. Az utóbbi időben törekvések indultak az *Sch. pombe*-vel közeli rokonságban álló fajok alaposabb megismerésére, ezt tükrözi, hogy a közelmúltban ezeknek a rokon fajoknak a teljes genomszekvenciája is elérhetővé vált a Broad Intézet *Schizosaccharomyces* csoporttal kapcsolatos honlapján. A hasadó élesztők csoportja korábban három fajból állt, melyek közé a *Sch. pombe*, *Sch. japonicus* és *Sch. octosporus* tartozott [Sipiczki, 2000]. Újabban felfedezték a *Sch. kambucha* [Singh és Klar 2002, 2003] és a *Sch. cryophilus* [Helston és mtsai, 2010]. Az előbbit azonban megfelelő leírás hiányában a taxonómiai közvélemény nem fogadta el.

A *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* (a továbbiakban egyszerűen *Sch. japonicus*) egy az Schizosaccharomycetales rendbe (**1. ábra**) tartozó egysejtű hasadóélesztő, melynek CBS 354 elnevezésű törzsét eperből erjesztett borból izolálták [Yukava és Maki, 1931]. A rokon fajhoz, a klasszikus és molekuláris genetika kedvelt modellszervezetéhez, a *Sch. pombe*-hez hasonlóan haploid genetikai állománnyal rendelkezik, amely lehetővé teszi, hogy az egyes mutációk fenotípusosan is megnyilvánuljanak. A *Sch. japonicus* élelciklusára,

szemben az *Sch. pombe* egysejtű életmenetével, a dimorfizmus jellemző: a fiatal telepek egyedül sejtjei szilárd táptalajon 8-10 nap elteltével többsejtű hifát fejlesztenek [Sipiczki és mtsai, 1998]. A *Sch. japonicus* ugyan nem patogén, de mivel egyes patogén fajokban, így például a növényi *Ustilago maydis*-ban [Bölker, 2001] és humán patogénekben például a *Candida albicans*-ban [Gow & Gooday, 1987] és *Histoplasma capsulatum*-ban [Eisenberg és mtsai, 1996] a dimorfizmus virulenciafaktorként szerepel, a *Sch. japonicus* vizsgálata hozzásegíthet a dimorf gombák virulenciájának megértéséhez és azon keresztül új gombaellenes terápiák kidolgozásához. Mindezek miatt a *Sch. japonicus* nemrégiben ígéretes modellorganizmussá vált [Rhind és mtsai, 2011].

A Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén hagyománya van az élesztő sejtciklus kutatásának. A sejtciklus utolsó lépése a sejtszeparáció és citokinézis, ennek tanulmányozásába kapcsolódtam be.

Az *Sch. pombe* sejtszeparációban részt vevő génjeinek funkciója alaposan tanulmányozott terület. Ezek a gének egy regulációs útvonalon találhatóak. A folyamat két fő transzkripciós faktora a Sep1p és Ace2p [Sipiczki és mtsai, 1993; Martin-Cuadrado és mtsai, 2003]. Ezek a transzkripciós szabályozók több célgénnel is rendelkeznek. Az *eng1<sup>+</sup>* gén terméke egy  $\beta$ -1,3 endoglukanáz, ami az elsődleges szeptum lebontásában; az *agn1<sup>+</sup>* által kódolt fehérje, az Agn1p, ami egy  $\alpha$ -1,3 glukanáz, pedig a szeptum szélénél levő, a még szét nem vált sejtek sejtfalának hidrolízisében vesz részt [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003; Dekker és mtsai, 2004; Garcia és mtsai, 2005]. A *mid2<sup>+</sup>* gén által biztosított Mid2p protein szerepe az ún. szeptin gyűrű létrehozásában van, amely segíti az Agn1p és Eng1p enzimek excitózisát [Berlin és mtsai, 2003; Tasto és mtsai, 2003].

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

Ezek alapján a következő célokat tűztük ki:

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

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

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A *Schizosaccharomyces japonicus* általános jellemzése

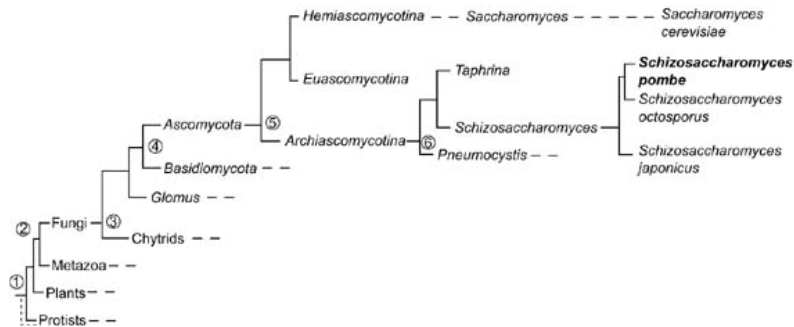
A *Schizosaccharomyces japonicus* hasadó élesztő két már korábban is ismert társával a *Sch. pombe*-vel és a *Sch. octosporus*-sal együtt a gombák országának *Ascomycota* törzsébe tartozik, rendszertani besorolása az **1. ábrán** látható [Sipiczki, 2000]. Az elsőként leírt hasadóélesztő a *Sch. pombe* volt. 1893-ban Lindner izolálta egy kelet-afrikai sörből, ezzel alapult meg a *Schizosaccharomyces* genus [Munz és mtsai, 1989]. A hasadóélesztők csoportjába tartozik két utóbb leírt faj a *Sch. kambucha* [Singh és Klar, 2002; 2003], melyet a taxonómia közvélemény nem fogadott el, és a *Sch. cryophilus* [Helston és mtsai, 2010]. Az **1. ábrán** látható, hogy a *Sch. japonicus* három varietas-szal rendelkezik (*Sch. japonicus* var. *japonicus*, - *longobardus*, - *versatilis*). Vizsgálatainkhoz a *Sch. japonicus* var. *japonicus*-t használtuk (a továbbiakban egyszerűen *Sch. japonicus*). A *Sch. japonicus* –t Yukava és Maki izolálta eperből készült borból [Yukava és Maki, 1931].

Királyság	<b><i>Mycota</i></b>
Törzs	<b><i>Ascomycota</i></b>
Altörzs	<b><i>Archiascomycotina</i></b> ( <i>Taphrinomycotina</i> )
Osztály	<b><i>Schizosaccharomycetes</i></b>
Rend	<b><i>Schizosaccharomycetales</i></b>
Család	<b><i>Schizosaccharomycetaceae</i></b>
Nemzetség	<b><i>Schizosaccharomyces</i></b>
Faj	<i>S. pombe</i> <i>S. pombe</i> var. <i>pombe</i> <i>S. pombe</i> var. <i>maldivorans</i> <i>S. japonicus</i> ( <i>Hasegawaea japonica</i> ) <i>S. japonicus</i> var. <i>japonicus</i> <i>S. japonicus</i> var. <i>longobardus</i> <i>S. japonicus</i> var. <i>versatilis</i> <i>S. octosporus</i> ( <i>Octosporomyces octosporus</i> )

### 1. ábra

A *Sch. japonicus* rendszertani besorolása [Sipiczki, 2000].

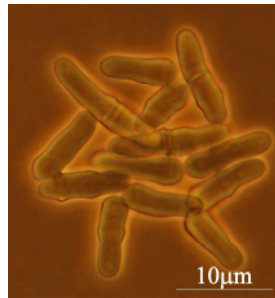
A **2. ábrán** látható a hasadó gombák feltételezhető filogenezise (törzsfajlódése), amelyet rRNS (riboszómális RNS) szekvencia és fehérje elemzésekre alapoznak [Sipiczki, 2000]. Azt valószínűsítik, hogy a hasadó élesztők ősei fonalas gombák voltak. A *Sch. japonicus* megőrizte a fonalas morfológiába való átváltás képességét [Sipiczki és mtsai, 1998], így korábban elkülönülhetett a közös őstől, mint a *Sch. octosporus* és a *Sch. pombe*, amelyek az evolúcióval elvesztették a hifás növekedés képességét [Sipiczki, 2000]. A HMG-Coa reductáz fehérje szekvencia elemzése alapján a *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztő törzsfajlódése 420 millió évvel ezelőtt vált el a hasadó élesztőkétől [Sipiczki, 2000].



**2. ábra**

A hasadó élesztők filogenezise (törzsfajlódése) [Sipiczki, 2000].

A *Sch. japonicus* sejtjei hengerek (3. ábra), méretük (5,0-9,0) x (6,0-14,0)  $\mu\text{m}$  [Yarrow, 1984] 3 napos 25 °C-on maláta tápoldatban történt tenyésztést követően. Sejtmérete nagyobb mint a *Sch. pombe* fajtársáé, ezért alkalmasabb a kondenzált mitótikus kromoszómák vizsgálatára [lásd például Alfa és Hyams, 1990 cikkét].



**3. ábra**

A *Sch. japonicus* sejtek mikroszkópi morfológiája YEA szilárd táptalajon 1 napos 30°C –os tenyésztést követően (Saját fáziskontraszt mikroszkópi felvétel).

Életciklusa a hasadó élesztőkére jellemző sajátosságokat mutatja (lásd 2.4. fejezet), különbség abban jelentkezik rokonfajaihoz képest, hogy nitrogén éhező körülmények között szilárd táptalajon képes valódi hifákat létrehozni [Sipiczki és mtsai, 1998], aminek leírása a következő fejezetben bővebben is megtalálható.

## **2.2. A *Schizosaccharomyces japonicus* egy dimorf élesztő**

A *Sch. japonicus* ebben a fejezetben leírt dimorfizálásának áttekintése Sipiczki és mtsai 1998-ban megjelent cikkei alapján készült.

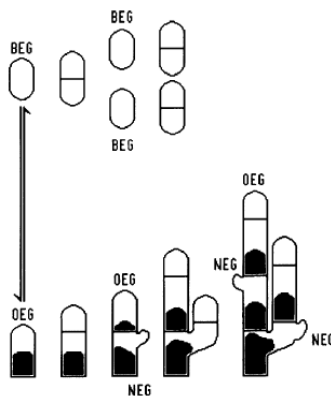
A *Sch. pombe* bipoláris növekedést mutat, ezért használható modellként a sejt polaritás és poláris növekedés tanulmányozására. A sejtek hengeresek és két növekedési pólussal rendelkeznek exponenciális fázisú tenyésztésükben. Polárisan nőnek, majd a megfelelő méret elérése után a sejt közepén szeptumot képeznek és kettéválnak. Folyékony tápközegben szinte az összes sejt a régi végén kezd el nőni, míg szilárd táptalajon vagy az új végükön vagy mind az új, mind a régi végükön nőnek.

Rokon faja a *Sch. japonicus* képes a bipoláris növekedésből unipolárisra váltani, és mind élesztő mind micélium formában nőni. Az első hifafonalak 30 °C-os tenyésztés során 6-10 nap múlva jelennek meg, kizárólag szilárd táptalajon. A hifák megjelenése nem függ a táptalaj összetételétől, de a tenyésztési hőmérséklettől igen, ugyanis 19 °C alatt és 35 °C felett nem jelennek meg. A fonalas növekedésre kizárólag szilárd táptalajon képes. A hifa nőhet a táptalaj belsejébe valódi micéliumot létrehozva, illetve csak a felszínén pszeudomicéliumként (álmicéliumként, azaz nem valódi hifaként). A pszeudomicélium úgy jön létre, hogy osztódás után a leánysejtek együtt maradnak [Van Der Walt és Yarrow, 1984]. Ha ez a további osztódásoknál is megtörténik, akkor sejtszortok illetve sejtláncok jönnek létre. A sejtláncok képződése vezet pszeudomicélium létrejöttéhez. Azaz a pszeudohifa úgy néz ki, mint egymásból kinövő, de el nem váló sarjak sorozata. Közöttük a szeptumoknál beszűkülések láthatók. A valódi hifák ezzel szemben úgy nőnek, hogy a csúcsi sejtben szeptum alakul ki, ami a sejtet ketté vágja (sarjra emlékeztető képlet nem jön létre és ennek megfelelően beszűkülés sincs a szeptumnál). Ezután a kialakult szeptum mögötti sejt a szeptum alatt közvetlenül létrehoz egy oldalágat, amelynek a csúcsa növekszik folyamatosan. Az apikális sejt is tovább növekszik, de csak a csúcán, a szeptum felé eső végén nem. Tehát a növekedés aszimmetrikus, unipoláris.

Az élesztő-micélium átalakulás, és a micélium növekedése a tápanyag gradiens (különbség) által szabályozott és intenzív vakuólumképzéssel kapcsolatos. A micélium képes

arthrokonídiummá alakulni vagy visszatérni az élesztő fázisba a környezeti tényezőktől függően. Az élesztő-micélium átalakulást nem a tápanyagok kimerülése eredményezi, ezt bizonyítja, hogy ha három vonalban oltottak le élesztőt, akkor csak a két szélső leoltás kezd hifát képezni. Ha a tápanyag gradienst megszakítják pl. úgy, hogy lyukat fúrnak az agarba, ott ahol már képződött micélium, ekkor a micélium növekedése leáll. Ha a növekedési vonal mögé fúrnak lyukat az agarba, és pepton illetve élesztő kivonat tartalmú tápoldatot pipettáznak a lyukba, ezzel megfordítva a tápanyag gradienst, a micélium növekedése is megfordul, és ez gyűrű alakú megvastagodásként látható. A glükóz és keményítő oldat hatására ezek a változások nem figyelhetőek meg, így arra lehet következtetni, hogy a nitrogén tápanyag gradienst okozza a micéliális növekedést.

A hifa kétféle morfológiát mutat. A táptalaj felszínén pseudomicéliumokat alkot, melyek helikálisak és előfordul bennük a citokinézis. A táptalajba penetráló, valódi micéliumokra pedig jellemző, hogy a sejtszétválás, szeptum hasítás ritka, az osztódó leánysejtek szorosan együttmaradnak. A felületi és invazív micélium több helyen kiindulva nőhet, ami arra utal, hogy az élesztő-micélium átalakulás ritkán elég sikeres ahhoz, hogy mindenhol micélium alakuljon ki.



4. ábra

A *Sch. japonicus* növekedése. A felső ábrán a hasadásos osztódás látható. (BEG: both ends growing, azaz mindkét végen történő növekedés). Az alsó ábra a hifanövekedést mutatja (NEG: new end growing, azaz a sejt új végén történő növekedés, OEG: old end growing, azaz a sejt régi végén történő növekedés) [Sipiczki és mtsai, 1998].

Kétféle növekedési sebességű hifa különíthető el az invazív hifákon belül. Az egyik típusú micélium egy vonalban nő egy állandó növekedési rátával. A másik típusú úgynevezett gyors hifa, a többi hifa előtt nő, és gyakran hifa kolóniákat (telepeket) képez,

amelyek leágaznak és tovább nőnek. Mind a két típusú hifa ugyanazt az elágazási mintázatot követi. A hifa csúcán található sejt sohasem ágazik el. A csúcsi sejt alatti sejtek a szeptum alatt ágaznak el, így egy új micéliumot létrehozva. DAPI (4'6'-diamidino-2 fenilindol) festéssel kimutatható, hogy a hifát alkotó sejtek mind egy-egy sejtmagot tartalmaznak.

Ellentétben a folyékony tápközeggel, ahol a tápanyagok eloszlása egyenletes, a szilárd táptalajon az élesztő először felhasználja a környezetében jelenlevő táplálékot, utána hifás növekedésre vált át, hogy a távolabbi részekre is eljuthasson. A hifa 12-30-szor gyorsabban nő az élesztőformánál. Ezt a nagymértékű növekedést az intenzív vakuolizáció teszi lehetővé. A hifa csúcsi sejtje aszimmetrikusan osztódik, és az újonnan képződő szeptum a csúcsi sejtben levő nagy vakuólum és a csúcs között félúton képződik. Az újonnan keletkező sejt elkezdi nőni, és a csúccsal ellentétes oldalon saját vakuóluma alakul ki. A citoplazma csak kis területet foglal el a sejt csúcsi részén. A szubapikális sejt „örököl” egy nagy vakuólumot az anyasejttől, elkezdi nőni a szeptum alatt elágazást képez, amelybe a vakuólum is belekerül. A csúcsi sejt aszimmetrikusan újra osztódik és az egész folyamat kezdődik előlről (**4. ábra**).

A növekedési vonal mögött a micélium régi részei tartalmaznak különböző méretű élesztő-szerű sejteket, amelyek valószínűleg a hifa feldarabolódásával keletkeznek. Ezeket a sejteket calcofluor fluoreszcens festéssel lehet megkülönböztetni a többitől. Ez a festék specifikusan a  $\beta$ -glukánhoz kötődik, amelyből sok található az elsődleges szeptumban, és kevesebb a sejtfalban. Az újonnan szintetizálódó sejtfalet ugyanis erősebben festődik calcofluorral a „rég” sejtfalethez képest. A hifa feldarabolódásából származó sejtek széli sejtfalet halványan festődik, középső része pedig erősen. Az élesztősejtek nem így festődnek, tehát a hifa feldarabolódásával ún. artrokonídiumok jönnek létre, melyek ezzel a módszerrel elkülöníthetők.

A szilárd táptalajon, ahol az élesztő micélium átalakulás lehetséges, a hifa addig képes kolonizálni a tápközeget, amíg tápanyag áll rendelkezésére, és fennáll a nitrogén gradiens. Ha a már kialakult hifadarabot eltávolították és friss táptalajra helyezték, akkor a micélium visszaalakul élesztő sejtekké. Az első szeptum 3-4 óra múlva jelenik meg az áthelyezés után a nagy vakuólum és a széli sejt csúcsa között. A második szeptum további 60-70 perc múlva tűnik fel a széli sejt mögötti leánysejtben. A harmadik pedig a második után 10-20 perccel formálódik a csúcsi leánysejtben. A létrejövő sejtek elkezdenek növekedni és sejtszeparáció után, mindkét végükön elkezdenek ismét nőni. A tipikus élesztő morfológia további három-négy osztódással később állapítható meg. A sejtfalet gyakori a

micélium-élesztő átalakulás közben, indukálható úgy is, hogy a kialakult micéliumokat 37 °C-ra helyezik.

Ha folyékony tápoldatban tenyésztik a *Sch. japonicus* sejteket, akkor a sejtek a rokon *Sch. pombe*-hoz hasonlóan bipoláris növekedést mutatnak (**4. ábra**), amely calcofluor festéssel nyomon követhető. A calcofluor az újonnan szintetizáló sejtfalat jobban festi a régió, a sejtek egyik vége sötétebb mint a többi. Ez az újonnan keletkezett sejt, a sötét régió pedig a citokinézis során a szeptumból formálódott. Ha a sejt már nőtt a létrejötté után az „új végén”, akkor mindkét vége világosan festődik, de látható benne gyűrű formájában egy sötétebb régió, ami a másodlagos szeptumból maradt meg. Sok sejtben található meg ez a sötétebb „osztódási heg”, minél többet osztódott a sejt, annál több. A sejtek többségének mindkét széle világosan festődik, ami tehát arra utal, hogy a növekedés bipoláris folyékony tápközegben az első 20-24 órában 30 °C -on történő inkubáció esetén a sejtek exponenciális fázisában. A szilárd táptalajon történő hosszabb idejű inkubálást követően a sejtek áttérnek az unipoláris növekedésre. Az „osztódási hegek” aszimmetrikusan helyezkednek el a sejt nem növekvő pólusán. Az aktin festésével is kimutatható az unipoláris növekedés, a hifában a növekvő végen koncentrálnak, míg az élesztő formában mindkét sejt-póluson találhatóak aktin filamentumok, osztódó, szeptált sejtek esetén pedig a szeptum régióban lokalizálódnak.

A *Sch. japonicus* élesztő-hifa átváltását intenzív vakuolizáció kíséri. A rövid, bipolárisan növekvő sejtek kis vakuólumokat tartalmaznak szétszóródva a citoplazmában. Az unipolárisan növekvő hifasejteketben egy-két nagy vakuólum található a szubapikális, nem növekvő póluson a kisebbek mögött. Az élesztősejtek mindkét végükön nőnek és a sejt közepén képeznek szeptumot, majd szétválnak. A hifasejt csak az egyik végén nő, és a szeptumot a nagy vakuólum és a csúcs közé képezi. A szeptummal létrejön egy kicsi vakuolizálatlan csúcsi leánysejt és egy sokkal hosszabb nagy vakuólummal rendelkező szubapikális leánysejt (**4. ábra**). A szubapikális leánysejt elágazhat szintén a vakuólummal ellentétes végénél, tehát a vakuólumnak egyfajta „lecsendesítő” szerepe van az unipoláris osztódásban, meghatározza azt a véget, amely nem fog tovább nőni. A sejtmag mindig a vakuólummal ellentétes végén, a növekvő végén található, így a vakuólum izolálja azt a nem növekvő pólustól. A sejtek vakuolizált végén nem találhatóak mikrotubulusok, hanem a növekvő vég és a nagy vakuólum között lokalizálódnak, a sejtmag körül kosár formájában és sokkal nagyobb mennyiségben, mint az élesztősejteketben.

A KCl és szorbit okozta ozmótikus stressz hatására a nagy vakuólumok helyett több kisebb jelenik meg a citoplazmában. A magas ozmótikus közegben is megmarad az unipoláris hifaszerű növekedés, tehát a vakuólumok önmagukban nem elegendőek hozzá.

Csak a sejtek mérete lesz kisebb, ami annak tulajdonítható, hogy a nagy vakuólumok hozzájárultak a nagyobb sejtmérethez.

A vakuólumok az invazív micéliumok kialakulásának is feltételei, ha a hifák kialakulása után gátolják a vakuolizációt (magas ozmótikus közeg kialakításával), akkor az invazív micéliumok kialakulása elmarad. Hasonló jelenséget a *Candida albicans*-ban is megfigyeltek [Gow, 1994].

A táptalaj megnövelt glükóz koncentrációja is csökkenti a hifák növekedését és a vakuólumok méretét, de valószínűleg nem az okozott ozmótikus stressz által, ugyanis sokkal alacsonyabb koncentrációban képes ezt a hatást okozni, mint a szorbit, hanem az intracelluláris cAMP szintre kifejtett hatásán keresztül. A koffein, amely szintén a cAMP szintet befolyásolja, hasonló hatásokat eredményezett, mint a glükóz. 10 mM koffein gátolja az élesztő sejtek növekedését, 5 mM alatti koffein koncentráció nincs hatással az élesztő sejtek növekedésére, de akadályozza a micéliális fázisba való átváltásukat, amely csak 0,5 mM koncentráció alatt következhet be. A koffein az élesztő sejtek morfológiájára is hatással van. 0,5 mM koncentrációnál drasztikusan csökkenti a sejtek hosszát és a vakuolizáció mértékét, míg 2 mM a vakuólumok növekedését gátolja. A teofillin gátolja a cAMP foszfodiészterázt és a *Candida albicans* dimorf átváltását eredményezi [Sabie and Gadd, 1992], míg a *Sch. japonicusra* és a *Sch. pombe*-re nincs hatása.

Nemcsak a hifára történő átváltás, hanem a már kialakult micélium is érzékeny a koffeinre. 0,5 M-os koffein oldat hatására, attól függően, hogy a hifa milyen távol van attól helytől az agarban, ahol a koffeint hozzáadták a táptalajhoz a hifa vagy elhal, vagy visszaalakul élesztő formába, vagy intenzív szeptáció indul be, tovább folytatja a növekedést sűrűn elágazó micéliumként. A cAMP-nek is hasonló hatása van: 0,03 M koncentrációban szeptációt és helyi micélium megvastagodást indukál, míg 0,1 M-nál megállítja a hifa növekedését.

A hőmérséklet is befolyással rendelkezik a dimorfizmusra. Ha a már kialakult hifát 19 °C -nál alacsonyabb illetve 35 °C -nál magasabb hőmérsékletre helyezik, akkor a hifa növekedése mindkét esetben megáll, intenzív szeptációs és fragmentálódási folyamat kezdődik. A fragmentumok bipolárisan kezdenek nőni, majd néhány nap után élesztő kolóniák (telepek) jelennek meg a hifafront elején, tehát a hőmérsékletnek hasonló a hatása, mint a cAMP-nek és koffeinnek.

A *Sch. pombe*-ben ha glükózra éhező sejtekhez glükózt adtak, akkor az intracelluláris cAMP szint megemelkedik az adenilát cikláz aktiválódása miatt [Byrne és Hoffmann, 1993]. Valószínű, hogy a *Sch. japonicus*-ban is a *Sch. pombe* mintájára a glükóz

magas intracelluláris cAMP szintet okoz, amely a sejteket élesztő formában tartja. A nitrogén éhezés a *Sch. pombe*-ben lecsökkent cAMP szintet eredményez, a *Sch. japonicus*-ban pedig ez indukálja az élesztő-micélium átalakulást. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a *Sch. japonicus* élesztő-micélium, illetve micélium-élesztő átalakulásai az intracelluláris cAMP szint növekedésével és csökkenésével szabályozódnak. A koffein is gátolja az élesztő-micélium átalakulást, ami így azzal magyarázható, hogy a koffein egy cAMP foszfodiészteráz inhibitor, így megnövekedett cAMP szintet okoz. A kívülről adott cAMP is hasonló hatást eredményez.

A *Sch. japonicus* hifaszepumok elektronmikroszkópikus vizsgálatai során megállapították hogy azok nem rendelkeznek pórusokkal, tehát a szomszédos sejtek citoplazmája nincs egymással kapcsolatban.

Az eukarióták világában gyakran előfordul, hogy a sejtek a megváltozott környezeti feltételekre cAMP szabályzáson keresztül válaszolnak, mint például a *Mucor* sp. dimorf átalakulása is cAMP szinthez kapcsolódik [Orlowski és Ross, 1981]. Az *Ustilago maydis*-ban az adenilát-cikláz génjének kiütése folyamatosan fennálló fonalas fenotípust eredményez [Gold és mtsai, 1994]. A *Histoplasma capsulatum*-ban az élesztő sejtek ötször magasabb cAMP szinttel rendelkeznek, mint a hifasejtek, tehát a szabályozás fordítva van, mint az előbbieken [Maresca és mtsai, 1977].

### **2.3. A dimorfizmus jelensége más gombafajokban**

#### **2.3.1. A *Schizosaccharomyces pombe* korlátozottan képes a fonalas növekedésre**

A *Sch. pombe* legtöbb törzse sosem képez hifát. Egyes törzseinél (NCYC132 homotallikus törzs) azonban megfigyelték, hogy ritkán és inkább csak speciális feltételek mellett előfordul a *Sch. japonicus* hifáihoz hasonló képletek létrehozása [Amoah-Buahin és mtsai, 2005, illetve Dodgson és mtsai, 2009]. Ezek az agar felületén, olyan láncszerűen növekvő sejtek, amelyek különböznek a normál vegetatív sejt morfológiától. A 30 °C-on tartott táptalajból izolált fonalak már hifára jellemző morfológiát mutattak. A táptalaj kevés nitrogén forrást tartalmazott, ezért feltételezhető, hogy a hifás növekedés *Sch. pombe* esetén is a nitrogén éhezés következménye. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal számos olyan struktúrát azonosítottak a hifás sejtekben, amelyek az élesztő formában nem találhatók meg, mint például nagy szabálytalan vakuólumok illetve jellegzetes vezikuláris struktúrák. Kívülről adott cAMP analóggal kiváltható volt a hifásodás, ami azt jelenti, hogy a hifaképzés magas cAMP szinttel kapcsolatos, ami ellentétes az *Sch. japonicus*-ban megfigyelttel, ahol az

intracelluláris cAMP szint csökkenése váltja ki a fonalas növekedést. [Sipiczki és mtsai, 1998]. Nem találtak a nitrogén mellett olyan tápanyagot, amely kiválthatná a hifásodást. Tizenkét olyan gént írtak le, melyek inaktiválása hifás növekedéshez vezethet. Ezek főként transzkripcióban, citoskeletális szabályozásban és membrán funkciók kialakításában vesznek részt [Amoah-Buahin és mtsai, 2005; Dodgson és mtsai, 2009].

### **2.3.2. A *Saccharomyces cerevisiae* képes pszeudohifa képzésére**

A *Saccharomyces cerevisiae*, a jól ismert pékélesztő, legtöbbször egysejtes élesztőformában növekszik. A hifás növekedés képességét 1920-ban írták le először [Guilliermond, 1920]. Később kimutatták, hogy a nitrogén éhezés hatására a *S. cerevisiae* ún. pszeudohifát („álhifát, nem valódi hifát) képez, ami abban különbözik a valódi hifától, hogy a sejtláncokban nem tűnik el a sejtek között a sejtfal [Gimeno és mtsai, 1992]. A fonalas növekedést beindíthatja a nitrogén éhezés, vagy limitáció, többértékű alkoholok jelenléte, kevés szénforrás, és bizonyos stresszállapotok [Gancedo, 2001; Dickinson, 2008]. A nitrogén éhezés során azért kedvező a fonalas forma, mert az élesztősejt szilárd közegben nem képes mozogni és elérni a tápanyagban gazdagabb területeket, fonalas formában viszont igen. A többértékű alkoholok akkor keletkeznek fiziológiásan a sejtben, ha nem az elsődleges nitrogénforrás van jelen (ammónium, glutamin, aszparagin stb), hanem elágazó láncú aminosavak, mint pl. leucin, izoleucin, valin vagy aromás aminosavak. Az ezek lebontásából keletkező többértékű alkoholok szignálmolekulaként viselkednek, ami kiváltja a fonalas növekedést [Dickinson, 2008].

A fonalas növekedés a *S. cerevisiae* esetében két útvonal által szabályozódik, az egyik a cAMP a másik a MAP kináz kaszkád útvonal. A két útvonal egymástól nem független, kapcsolatban állnak egymással [Gancedo, 2001; Lengeler és mtsai, 2000]. A pszeudohifa képzés megnövekedett kitin termelést igényel, ugyanis a hifák nagy mennyiségű kitint tartalmaznak nemcsak a szeptális régióban, ami szilárdabbá, és merevebbé teszi a fonalakat, így lehetővé teszi a szilárd táptalajba történő inváziójukat. A pszeudohifát könnyen képző törzsben 30-szor kevesebb kitináz aktivitás és 70%-kal magasabb kitin szint figyelhető meg, mint abban a törzsben amelyik nem képes fonalakat létrehozni [Dickinson, 2008].

Az Ace2p a *CTSI* kitináz gén pozitív szabályozója, génjének deléciója pszeudohifa képzést okoz. A *CTSI* inaktiválása is hifaképzést eredményez, de nem olyan mértékűt mint az *ACE2* inaktiválása, tehát az *ACE2* valószínűleg más géneket is szabályoz, melyek részt

vehetnek a hifaképzésben. Számos egyéb gént is leírtak melyek szerepet játszhatnak a pszeudohifa növekedésben, de nehéz meghatározni, hogy direkt vagy indirekt módon teszik-e azt [Gancedo, 2001].

### **2.3.3. A *Candida albicans* dimorfizmusának szerepe lehet a patogenitásban**

A *Candida albicans* egy opportunistá patogén gomba, mely melegvérű szervezetekben, így az emberben is megtalálható. Normál esetben a szájüreg, hüvely és az emésztőrendszer nyálkájában fordul elő. Betegséget elsősorban az immunszuppresszált betegekben alakít ki [Odds, 1988]. A *C. albicans* három morfológiai formában tud növekedni: élesztőként, pszeudohifaként és valódi hifaként [Odds, 1988]. Mind a hifa mind a pszeudohifa forma is invazív. A fonalas forma segíti a szövetek penetrációját, míg az élesztő formát a véráramban való terjedésre használja. A fenotípusos váltás mindenképpen szerepet játszik a virulenciában [Calderone, 2002]. A morfológiai váltást számos környezeti tényező idézheti elő, ezek Sudbery és mtsai összefoglaló cikkében megtalálhatóak [Sudbery és mtsai, 2004]. A *Candida* élesztőformában nő, ha a hőmérséklet 30°C, a pH 4 alatt van és a sejtek sűrűsége magas, ekkor ún. farmezolt termel ami gátolja a micélium kialakulását [Hornby és mtsai, 2001]. Pszeudohifát képez, ha a pH 6,0 a hőmérséklet 35 °C, a nitrogén forrás korlátozott szilárd táptalajon, magas foszfát koncentráció jelenlétében. A hifák pedig akkor jelennek meg, ha a szérum hőmérséklete magasabb, mint 34 °C, vagy ún. Lee tápoldatban (37 °C) nőnek, a pH 7,0 és N-acetil-glükózamin van jelen. Ezek mellett vannak egyéb olyan körülmények, melyek fonalas növekedést indukálnak, mikor a makrofágok bekebelezik, spider agar, vaséhezés, oxigénhiány. A morfológiai átváltásban két jelátviteli útvonal vesz részt [összefoglalva Lengeler, 2000 cikkében], amelyek megtalálhatóak a *S. cerevisiae*-ben is. Az egyik a cAMP függő útvonal, melynek célfehérjéje az Efg1p transzkripciós faktor. Azok a mutánsok, melyekben nincs meg egyik útvonal sem, nem képesek hifaképzésre és avirulensek, de már egy útvonal elegendő ezek meglétéhez.

Azonosítottak a *Candida albicans*-ban [Bensen és mtsai, 2002] egy Fkh (forkhead)-szerű fehérjét, melynek hiányában állandó pszeudohifás növekedést mutatott, ami azt jelezheti, hogy szerepe van a valódi hifák és élesztőforma kialakításában. Az Efg1p vagy Cph1p fehérjék (a MAP kináz és cAMP útvonal fehérjéi) nem szükségesek a *fkh2* mutáns pszeudohifás növekedéséhez, ami azt jelzi, hogy a Fkh2p a szabályozásban vagy alattuk áll, vagy valamelyik párhuzamos útvonalon. A *fkh2Δ* pszedudohifa kisebb virulenciát mutatott *in vitro* az epitéliás és endotél sejtekkel szemben. Megállapították, hogy a Fkh2p számos

sejtszeparációban résztvevő gént is szabályoz. Közéjük tartozik a *CHT2* endokitináz gén, amelynek expressziója élesztősejtekben magasabb, mint a hifákban. A Fkh2p a valódi hifák kialakulásában is szerepet játszik és a hifa specifikus gének magas expressziójához is hozzájárul. Nem bizonyították, hogy az Fkh2p a hifaszpecifikus gének transzkripciójára direkt vagy indirekt befolyással rendelkezik.

A *Candida albicans*-ban az Ace2p legalább 20 sejtfal gén expressziójához szükséges [Mulhern és mtsai, 2006]. Az Ace2p, akárcsak a *S. cerevisiae*-nél, a leánysejt sejtmagjában található. Az Ace2p feltehetően szerepet játszik az alacsony oxigénkoncentráció (hipoxia) által kiváltott hifaképzésben. A fonalas formába való átalakulás a vad típusú sejtekben a csökkent mértékű légzés hatására következhet be. Azok a mutánsok, amelyek megnövekedett légzési aktivitással rendelkeznek, nem képesek hifát képezni hipoxiás körülmények között.

#### **2.3.4. Egyéb gombafajok dimorfizmusa**

A következő növénypatogén gombafajok dimorfizmusát Nadal és mtsai, 2008-as összefoglaló cikke alapján tekintjük át.

Az *Ustilago maydis* egy bazidiumos növénypatogén gombafaj, amely a kukorica üszöggombásodásáért felelős, melynek tünete a tumorszerű gumók megjelenése. Erre a gombára jellemző egy növényen kívüli szaprotróf, haploid, egysejtes fázis és egy parazita, dikarionos fonalas fázis a növényen belül. A szaprofita fázisban a haploid spórák sarjadzással osztódnak és nem képesek megfertőzni a növényt, csak azután, miután lejátszódott a párosodás. A párosodási típusért felelős „a” lókuszt két szorosan kapcsolt gén tartalmaz, az egyik a *mfa1*, amely lipopeptid feromont, a másik a *pra1*, amely pedig egy hét transzmembrán motívumot tartalmazó receptort kódol. A feromon-receptor felelős a sejtfelismerésért és fúzióért. Amikor a feromon kötődik a receptorhoz, a receptor irányítja a sejtfelismerést, és elindítja a szexuális ciklust. Ekkor a sejt megáll a G<sub>2</sub> sejtciklus fázisban és felkészül a konjugációs tömlő létrehozására. A dimorfizmusban és párosodásban a MAP kináz és cAMP függő útvonal játszik szerepet. A növényi gazdaszervezet még ismeretlen eredetű jele a cAMP függő útvonalat aktiválja, míg a Mfa1 feromon a Pra1 7TM receptorhoz kötődve a MAP kináz útvonalat. A Prf1 a MAP kináz és cAMP dependens jelátviteli útvonalban is szerepet játszik.

A *Ceratocystis ulmi* a holland szilfa betegségét okozó növénypatogén gombafajban a dimorfizmus haploid izolátumokban jellemző. Környezeti hatásokra következik be, és

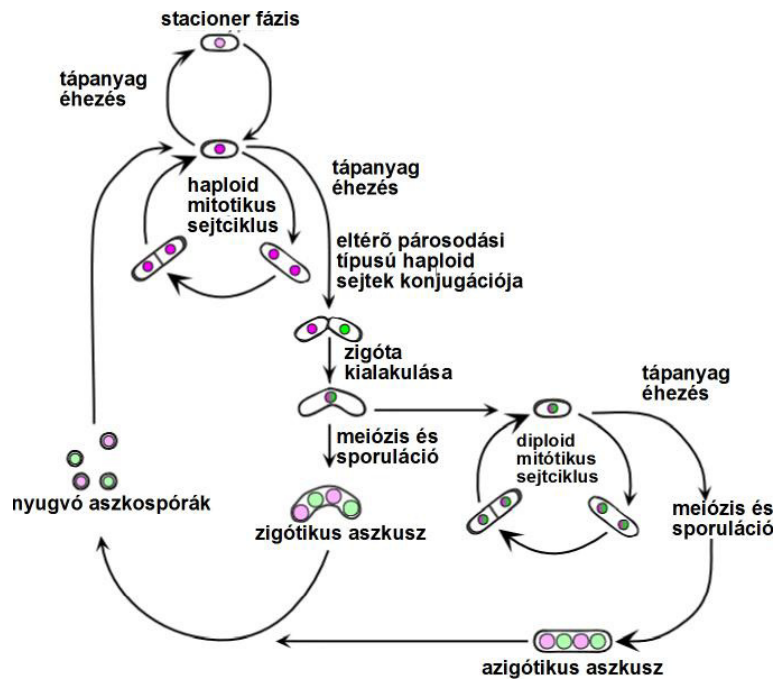
nincs kapcsolatban a párosodással. A nitrogén forrásnak van szerepe a fonalas forma kialakulásában. Prolin tartalmú táptalajon élesztő formában nő, míg ammónium, arginin és aszparagin tartalmún pedig fonalassá vált át. Jellemző még, hogy a sejtek számától is függ a micélium megjelenése,  $10^6$  sejt/ml koncentráció felett csak élesztő formában nő, míg ez alatt hifát alkot. A gomba patogenitása a *Candida*-hoz hasonló, a fáról –fáról való terjedés élesztő formában történik, és a faelemben is passzívan szállítható, míg az egyéb növényi szövetek fertőzésekor alakul át micéliumos fázisba, hogy képes legyen behatolni a sejtek közé.

A *Taphrina deformans* a barack és mandula levelein okoz megbetegedést, dimorfizmusát valószínűleg a gazdaszervezet jelei és a ploiditás is befolyásolja. A *Mycosphaerella graminicola* a búza egyik legfontosabb megbetegítője, melynek patogenitása kapcsolatba hozható dimorfizmusával. Az élesztőszerű megjelenésről átvált fertőző fonalas formába és behatol a levélbe, annak légzőnyílásain keresztül. A cAMP függő és MAP kináz kaskád szerepét a dimorfizmusban ennél a fajnál is kimutatták. A *Holleya sinecauda*-ra, a mustármag gombás megbetegedését okozó *Ascomycota* törzsbe tartozó gombafajra szintén jellemző a dimorfizmus, pszeudohifát is képez. A *Blastomyces dermatitidis* emlős patogén a talajban fonalas morfológiájú szaprobiótaként él, míg a gazdaszervezetbe bekerülve átvált élesztő fázisba, amelyet a hőmérséklet változás indukál ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a talaj,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a gazdaszervezet hőmérséklete). A *Cryptococcus neoformans* immunokompromittált betegekben okoz gombaeredetű agyhártyagyulladást [Lin, 2009]. A természetben a talajban is megtalálható gombafaj sarjadzó élesztő formában fordul elő. Pszeudohifát akkor alakít ki, ha természetes ellensége az *Acanthamoeba polyphaga* közelébe kerül. Lehet, hogy a pszedudohifa megvédi az amőba fagocitózisától, vagy fagocitózis után alakul ki a hifa, amely segíti az amőbából való kiszabadulását, és továbbterjedését, hasonlóan a *Candida albicans* viselkedéséhez a makrofágokban. A humán szervezetből csak ritkán mutatható ki a fonalas alak. A testhőmérséklet ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) illetve a magas  $\text{CO}_2$  koncentráció gátolja a hifák kialakulását. A hifanövekedés szabályozásában itt is a MAP kináz és cAMP függő útvonal vesz részt.

#### 2.4. A hasadó élesztők életciklusa

Az életciklus főbb jellemzőit MacNeill és Nurse 1997 áttekintő írása alapján a következőképpen foglalhatjuk össze (5. ábra). A hasadó élesztők életciklusa rendelkezik haploid és diploid fázissal. A *Sch. pombe*-re a haploid fázis a jellemző, ekkor mitózissal osztódik, de a tápanyag éhezés következtében több eltérő fejlődési lehetőség is létezik. Ha

csak megegyező párosodású sejtek vannak jelen a sejt kultúrában, akkor a sejtek kiléphetnek a mitotikus sejt ciklusból a stacioner fázisba ( $G_0$  fázis). Ha eltérő párosodási típusú ( $h^+$  és  $h^-$ ) sejteket tartalmaz a kultúra, akkor közöttük végbemehet a párosodás és a magfúzió, melynek eredményeképpen diploid zigóta jön létre. A diploid zigóta körülményektől függően meiózisba lép, zigótikus asszkusszá válik, amelyből aszkospórák szabadulnak ki. Az aszkospórák haploid sejteket hoznak létre. A diploid zigóta is képes vegetatív osztódásra, és ha ebben a diploid fázisú sejtben meggy végbe tápanyag éhezésre a meiózis, akkor ún. azigótikus asskusz jön létre, amelyből kiszabadul az aszkospórák szintén haploidok, és haploid sejteket hoznak létre.



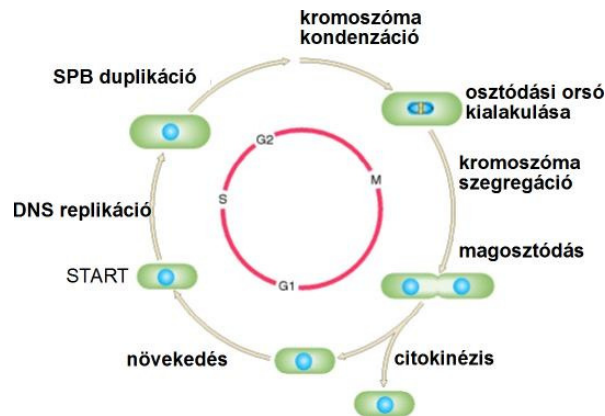
5. ábra

A hasadó élesztők életciklusa [MacNeill és Nurse, 1997].

## 2.5. A *Sch. pombe* sejt ciklusa

A *Sch. pombe* sejt ciklusának rövid áttekintése MacNeill és Nurse (1997), Su és Yanagida (1997), Fantes (1984), Moser és Russel (2000) összefoglaló leírásai és Sveiczter és mtsai (2000) modelljei alapján történik.

A hasadó élesztő mitótikus sejtciklusa a magasabb rendű eukariótákhoz hasonlóan  $G_1$ , S,  $G_2$  és M fázisra osztható (6. ábra). A  $G_1$  és S fázisok viszonylag rövidek kb. 20 percesek minimál táptalajon 25 °C-on tenyésztett vad típusú sejt esetében. A  $G_2$  fázis 120 percig tart, a mitózis szintén rövid a teljes ciklus időtartamához viszonyítva. A  $G_2$  fázis után a sejt az M fázisba lép, melynek jellemzője a kromoszóma kondenzáció és az, hogy egy gyors citoskeletális átrendeződéssel létrejön egy mikrotubulusokból álló sejttagon belüli osztódási orsó. A magmembrán a mitózis során nem bomlik le. A kondenzált kromoszómák csak a metafázis során válnak láthatóvá, ekkor válnak szét a testvérkromatidák.



6. ábra

A *Sch. pombe* mitótikus sejtciklusa (SPB=single pole body: osztódást szabályozó központ) [Griffiths és mtsai, 2000].

A mitózis következő fázisa a citokinézis és a sejtosztódás, melyek során szeptum képződik a sejt közepén, majd annak hasadásával elválik a két leánysejt. A  $G_1$  fázis közvetlenül a magosztódás után kezdődik, ezt követő S fázisban történik a DNS állomány megkettződése. A *Sch. pombe* sejtciklusában több fontos ellenőrző pont található, a  $G_1$  és S a  $G_2$  és M és a metafázis/anafázis határán. A  $G_1$  és S fázis közötti ellenőrző pontot „start”pontnak is nevezik, ekkor köteleződik el a sejt a mitózis irányába. Ha ez nem történik meg, akkor a sejt a  $G_0$  stádiumba (elfogadottabb elnevezése: stacioner fázis) vonul, vagy bizonyos környezeti ingerek hatására a szexuális ciklusba lép. A „start” ponton való áthaladás feltétele, hogy az előző mitótikus fázis befejeződjön, és a sejt elérjen egy bizonyos méretet. A másik, a  $G_2$ -M ellenőrző ponton való áthaladásnak is követelménye egy elért sejtméret és az, hogy az S fázisban DNS replikáció és DNS javító mechanizmusok már lejátszódtak legyenek. A sejtciklus gének fehérjetermékei többek között a következő

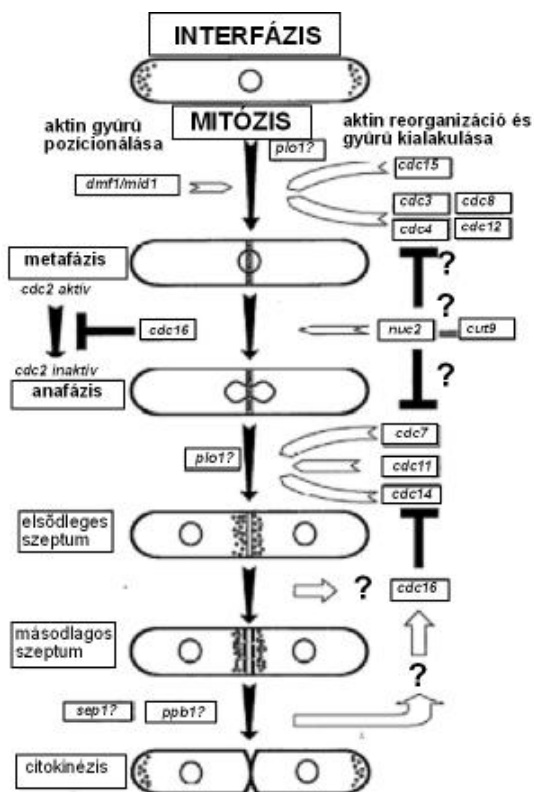
feladatokat látják el: a G1/S átmenet szabályozása (*cdc2, cdc10, cig2, rep1, rep2, res1, res2*, stb.); DNS replikáció (*cdc1, cdc23, cdc24, cdt1, cut5, mcm3, mis5, nda1, nda4, pol1, pol2, pol3, stb.*); DNS repair mechanizmusok (*hus1, rad1, rad3, rad9, rad17, rad24*, stb.); G2/M átmenet szabályozása (*cdc2, cdc5, cdc13, cdc25, cdc28, cig1*, stb.); citokinézis (*cdc3, cdc4, cdc8, cdc12*, stb.) és szeptumképzés (*plo1, cdc11, cdc16, stb.*). A sejtciklus fő szabályozói a ciklinek és a ciklindependens kinázok, tehát a regulációban nagy szerepe van a foszforilálásnak és defoszforilálásnak. A mitózis iniciáció kulcsfontosságú ciklindependens kináza a *cdc2* gén terméke a p34<sup>cdc2</sup> kináz. A p34<sup>cdc2</sup> aktivitása felel a DNS replikáció és a mitózis elindításáért. Aktivitását sok más protein befolyásolja, ezek közé tartoznak a G<sub>1</sub> (*puc1, cig1*) S(*cig2*) és M fázis (*cdc13*) ciklinek, amelyek periodikusan kapcsolódnak hozzá. A mitózishoz vezető út során a p34<sup>cdc2</sup> aktivitását a *wee1* gén terméke p107<sup>wee1</sup> kináz gátló foszforilációja és a *cdc25* gén terméke a p80<sup>cdc25</sup> serkentő defoszforilációja is szabályozza, ezzel biztosítva, hogy a p34<sup>cdc2</sup> aktivitása csak a G<sub>2</sub> végére érje el a mitózis iniciálásához szükséges mértéket [Nurse, 1993]. Tehát az alapvető fontosságú mitótikus méret megtartásában a Cdc25p és Wee1p molekuláknak van szerepe. A sejtciklus helyes végrehajtásához szükséges egyéb ellenőrzési folyamatok (például DNS replikáció helyes végrehajtása; vagy a DNS károsodások vizsgálata) is hatást fejtenek ki a Cdc25p és Wee1p központi regulátormolekulákon keresztül a p34<sup>cdc2</sup> aktivitására, ezzel is biztosítva a mitózis megfelelő időben történő iniciációját. A *cdc2* gén *CDC2* humán homológja képes komplementálni a *Sch. pombe cdc2* mutációját [Lee és Nurse, 1987], ami a sejtciklusban szereplő gének és a sejtciklus szabályozási logikájának konzervativizmusát jelzi.

Munkánk során a sejtciklus szeptumképződés és hasítás szakaszával foglalkoztunk, melynek részletesebb leírása a következő fejezetben található.

## 2.6. A *Sch. pombe* szeptumképzése és citokinézise

A *Sch. pombe* szeptációjának és citokinézisének áttekintése Simanis, 1995-ös összefoglaló cikke alapján történik (7. ábra). A sejt mindkét oldalán nőni kezd, majd közepén szeptumot képez, és a leánysejtek elváltnak. A sejtosztódás során a citoszkeleton meghatározott átrendeződéseken megy keresztül. Az interfázis alatt az aktinmolekulák a sejt növekvő végén lokalizálódnak. A mitózis kezdetekor az aktinszálak átcsoportosulnak a sejtmag köré, ahol az ekvatoriális (egyenlítői) síkban gyűrűt hoznak létre. Az aktinyűrű lokalizálja a szeptumképzés helyét. Az aktinyűrű összeszerelésében a *cdc3, cdc4, cdc8, cdc12* és a *cdc15*, míg a helyes pozíciójához a *dmf1/mid1* gének termékei szükségesek. A

sejtciklus következő lépéseként létrejön az elsődleges szeptum, amelyhez többek között *cdc7*, *cdc11*, és *cdc14* gének aktivitása szükséges. Azt a jelátviteli útvonalat, amely szabályozza a *Sch. pombe*-ben a kontraktilis aktomiozin gyűrű összehúzódását, a szeptációt, a mag-és sejtosztódást hasadó élesztő szeptációs iniciációs hálózatnak (angol rövidítése: SIN, azaz septation initiation network) nevezzük [Simanis, 2003; Krapp és mtsai, 2004; Krapp és Simanis, 2008]. A *S. cerevisiae*-ben a SIN megfelelője a MEN (mitotic exit network- „mitózisból kilépő hálózat”) [Bardin és Amon, 2001]. A SIN génekben mutáns *Sch. pombe* képes aktin gyűrűt létrehozni, de osztódó szeptumot nem tud szintetizálni. A szeptum bioszintézise közben, az aktin gyűrű aktin vezikulumokká alakul.



7. ábra

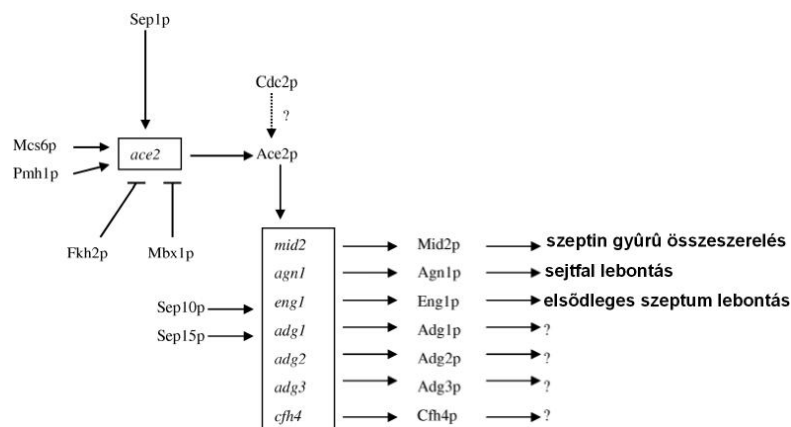
A *Sch. pombe* szeptum képzésének és citokinézisének főbb lépései [Simanis, 1995].

A másodlagos szeptum az elsődleges két oldalán jön létre. Az elsődleges szeptum a sejtosztódás végén feloldódik annak érdekében, hogy a két leánysejt el tudjon válni egymástól (az *Agn1p* és *Eng1p* vesz részt benne, lásd később). A sejtszeparációban is számos gén terméke vesz részt, például a *sep1*<sup>+</sup> (részletesebben lásd következő fejezet),

illetve a *ppb1* foszfatáz géné. A sejtsztódás befejezésére az aktin visszakerül a leánysejtek végeire. A mitózis és a citokinézis eseményei egymástól függetlenül zajlanak. A szeptumképzés iniciációja nem függ a mitózis befejezésétől [Nurse és mtsai, 1976].

## 2.7. A *Sch. pombe* sejtszeparációjában részt vevő génjei

A **8. ábrán** láthatóak a *Sch. pombe* sejtszeparációban részt vevő fő génjei. A gének és róluk keletkező fehérjetermékek részletesebb jellemzése a következő fejezetekben található. A sejtszeparációhoz vezető transzkripciósi útvonal több összefoglaló cikkben is leírásra került [például: Sipiczki, 2007; Bähler, 2005]. A továbbiakban ezek alapján mutatjuk be a gének és termékeik szerepét.

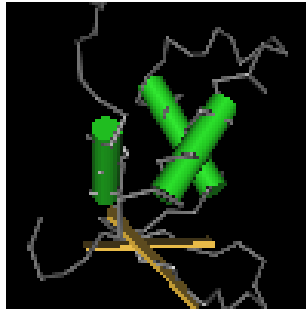


**8. ábra**

A *Sch. pombe* sejtszeparációjában résztvevő génjei és azok szerepe [Sipiczki, 2007].

### 2.7.1. A Sep1p-Ace2p sejtszeparációs reguláló faktorok

A *sep1*<sup>+</sup> az elsőként leírt sejt-szeparációs gén, amely egy fork-head típusú DNS domént tartalmazó transzkripciósi faktort kódol [Ribár és mtsai, 1997]. A HNF-3 fork-head típusú domén (**9. ábra**) egy körülbelül 100 aminosavból álló konzervált domén, amely a DNS kötésért felelős. Számos eukarióta fajban, mint *S. cerevisiae*, *Drosophila*, patkány, egér és az ember meglévő transzkripciósi faktorai tartalmazzák ezt a típusú domént [Kaufmann és Knöckel, 1996]. A fork-head domént először *Drosophila*-ban írták le, olyan transzkripciósi faktorként, amely a terminális differenciációt serkenti a szelvényessel szemben [Weigel és mtsai, 1989]. A domén 2 flexibilis „szárnyat” tartalmaz a C- terminális régióban [Kaufmann és Knöckel, 1996].



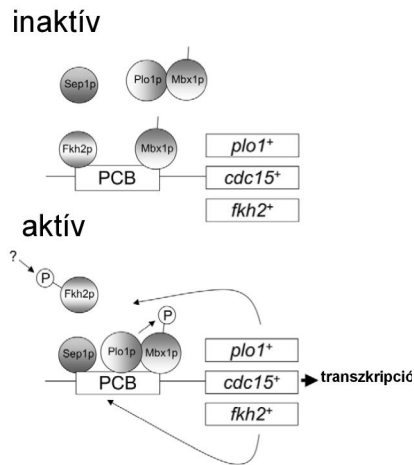
**9. ábra**

A fork-head domén térbeli szerkezete [forrás: NCBI conserved domains adatbázis].

A *sep1<sup>+</sup>* gén a *Sch. pombe* II. kromoszóma jobb karjának középső részén található [Sipiczki és mtsai, 1993]. Mutációja sejtszeparációban jelentkező hibát okoz, a bipolárisan osztódó sejtek nem képesek elhasítani a szeptumot, és így maximum 15 sejtől felépülő elágazó sejtláncok jönnek létre [Sipiczki és mtsai, 1993]. A Sep1p más faktorokkal kölcsönhatva szerepet játszik az M/G<sub>1</sub> sejtciklus átmenetben (**10. ábra**) [Papadopoulou és mtsai, 2008]. A Fkh2p represszorként kötődik a *plo1<sup>+</sup>*, *cdc15<sup>+</sup>*, *fkh2<sup>+</sup>* gének promóteréhez. Valószínűleg hiszton módosító enzimek is részt vesznek ebben a génlecsendesítésben. A Plo1p az Mbx1p és Sep1p kötődése feltételezhető kromatin módosítással lehetővé teszi a PCB motívummal rendelkező célgének átíródását. Ezzel a mechanizmussal, a Plo1p és Fkh2p szabályozza saját génjének átírását is.

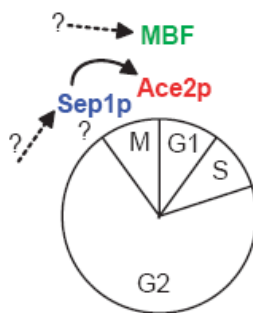
Microarray adatok kimutatták, hogy a Sep1p a sejtszeparáció kulcsregulátora, de más folyamatokban is részt vesz szabályozóként [Rustici és mtsai, 2004]. A sejtciklus során az elsőként aktiválódó gének csoportjába tartozik (**11. ábra**). Negyvenhat Sep1p függő gént mutattak ki a *sep1Δ* microarray vizsgálatával, melyek periodikus transzkripcióval rendelkeznek [Rustici és mtsai, 2004].

A Sep1p valószínűleg poszt-transzkripciósan szabályozódik, mert mRNS szintje nem mutat periodicitást a sejtciklus alatt [Zilahi és mtsai, 2000, Rustici és mtsai, 2004]. A sejtciklusban szereplő gének második hullámának aktiválódásáért (17 második hullámba tartozó gént szabályoz) az Ace2p felelős (**11. ábra**).



10. ábra

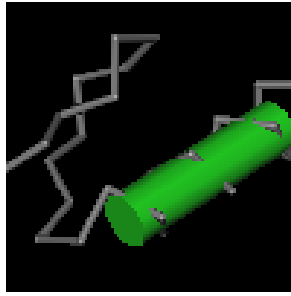
A Sep1p, Fkh2p, Plo1p transzkripciós faktorok szabályozó szerepe az M-G<sub>1</sub> sejtciklus átmenetnél [Papadopoulou és mtsai, 2008].



11. ábra

A Sep1p, Ace2p és MBF transzkripciós faktorok megjelenése a sejtciklus folyamán [Rustici és mtsai, 2004].

Az Ace2p célgénnek mellett a második hullámot a *Mlu1* sejt ciklus box (MCB) kötő faktor (MBF) (11. ábra) által szabályozott gének alkotják, amelyek a G<sub>1</sub>-S átmenetben és a DNS replikációban játszanak szerepet [Rustici és mtsai, 2004]. Az Ace2p egy cink-ujj DNS domént tartalmazó transzkripciós faktor [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003]. A cink-ujj doménnel (12. ábra) bíró fehérjék különféle sejtszintű szabályozásokban vesznek részt, mint a fejlődés, differenciáció és tumor szuppresszió. A doménben 2-2 konzervált cisztein és hisztidin aminosav között található egy cink ion [Iuchi, 2000].



**12. ábra**

A cink-ujj DNS kötő domén szerkezete [NCBI conserved domain adatbázis szerint].

Az *ace2Δ* sejtek fenotípusa nem különbözik a láncos *sep1Δ* sejtekétől, és az *ace2<sup>+</sup>* túltermelés elnyomja a *sep1Δ* fenotípust [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003], tehát a Sep1p az *ace2<sup>+</sup>* génen keresztül szabályozza a sejtszeparációs gének átírását. A *Sch. pombe ace2<sup>+</sup>* gén promótere öt TGTTTAC konszenzus szekvenciahelyet tartalmaz, amelyeket a *S. cerevisiae*-ben írtak le először és a Sep1p fork-head típusú transzkripció faktor kötőhelyei [Alonso-Nuñez és mtsai, 2005]. Ez is azt bizonyítja, hogy a Sep1p szabályozza az *ace2<sup>+</sup>* gén transzkripcióját. A Sep1p mellett az Fkh2p (fork-head protein) és az Mbx1p (MADS box protein) is részt vesz az *ace2<sup>+</sup>* gén transzkripció szabályozásában, de ezek negatívan (**8. ábra**) [Buck és mtsai, 2004; Rustici és mtsai, 2004; Petit és mtsai, 2005]. Az Ace2p poszttranszlációsan szabályozódik, 11 részleges és teljes CDK (ciklin-dependens kináz) foszforilációs helyet tartalmaz, tehát a Cdc2p részt vesz a szabályozásában (**8. ábra**) [Petit és mtsai, 2005]. Az Ace2p célgénjei között szerepelnek a szeptum feloldáshoz szükséges enzimek (Eng1p, Agn1p); a szeptin gyűrű fontos organizátora (Mid2p) illetve az Adg1p, Adg2p, Adg3p és Cfh4p fehérjék, melyeknek pontos szerepe még nem ismert [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003; Alonso-Nuñez és mtsai, 2005; Bähler; 2005; Dekker és mtsai, 2006]. Az Ace2p függő gének promóter régiója tartalmaz konszenzus CCAGCC szekvenciákat, amelyek feltehetőleg az Ace2p kötőhelyeként funkcionálnak [Rustici és mtsai, 2004; Alonso-Nuñez és mtsai, 2005]. A Sep1p-Ace2p regulációs kaszkád feltehetőleg nem az egyedüli szabályozója a sejtszeparációs folyamatoknak, ugyanis a *sep1-1* mutáns törzs öregedő tenyészetében megtalálhatóak sejtszeparáción túlegett egyedi sejtek [Sipiczki és mtsai, 1993].

Az *ace2<sup>+</sup>* gén homológja *Candida albicans*-ban is megtalálható, mutációja sejtszeparációs hibát okoz és egyúttal a virulenciájának csökkenésével is [Kelly és mtsai, 2004]. A *Candida glabrata*-ban viszont hipervirulenciát eredményezett az *ace2<sup>+</sup>* gén inaktiválása [Kamran és mtsai, 2004].

### 2.7.2. A szeptum szerkezete és a sejtszeparáció enzimei

A sejtszeparációhoz szükséges az elsődleges szeptum és a szeptum széleinél levő sejtfa feloldása [Johnson és mtsai, 1973]. Az érett szeptum egy három rétegből álló struktúra, amely egy belső elsődleges szeptumból és azt két oldalról körülvevő másodlagos szeptumból épül fel [Johnson és mtsai, 1973]. Az elsődleges szeptum lineáris 1,3- $\beta$ -glukánból épül fel [pl. Horisberger és Rouver-Vauthey, 1985], amely calcofluor fluoreszcens festékkel erősen festődik. A másodlagos szeptum 1,3- $\alpha$  glukánt, 1,6 elágazású 1,3- $\beta$  glukánt, 1,6- $\beta$  glukánt és galaktomannánokat tartalmaz [pl. Horisberger és Rouver-Vauthey, 1985], kevésbé festődik calcofluorral, mint az elsődleges szeptum. Sejtszeparáció után a sejtfa részévé válik, ezért egy „sötét sapkaként” látható az „új végén” a calcofluorral festett leánysejt szélén. A szeptum részei még az ismeretlen funkciójú MTD (materiel triangulaire dense) és a fuscannel, amelyek az elsődleges szeptum széleihez kapcsolódnak [Dekker és mtsai, 2004]. A szeparációs folyamat az elsődleges szeptum szélénél lévő sejtfa feloldásával kezdődik, amelyben az Agn1p 1,3- $\alpha$  glukánáz vesz részt [Dekker és mtsai, 2004; Garcia és mtsai 2005]. Ez a periodikusan termelődő enzim a szeptumrégióban lokalizálódik a szeparáció alatt [Garcia és mtsai, 2005].

A *Sch. pombe agn1 $\Delta$*  sejtek hamarabb elérik a sejtosztódás plató fázisát a vad típushoz képest [Garcia és mtsai, 2005]. A morfológiájukra jellemző, hogy a sejtek nagyobb arányban tartalmazznak szeptumot (48% az egy szeptumos, 5% két vagy több szeptumos sejteké), és kapcsolódnak vég-vég illeszkedésekkel egymáshoz, mint a vad típusban (7-15% szeptumos sejt) [Garcia és mtsai, 2005]. Szinkronizált tenyészetben (*cdc25-22*) megvizsgálták a vad törzs és az *agn1 $\Delta$*  szeparációs indexét. Mindkét törzsben 100 perccel az áthelyezés után a legmagasabb a tenyészet szeparációs indexe, a vad típusban ezután a sejtek elkezdik a következő osztódási ciklust, a szeparációs index csökken, míg az *agn1 $\Delta$*  sejtekben a szeparációs index beáll egy adott értékre és csak később csökken. 200-300 perc után az *agn1 $\Delta$*  sejtek 100%-a tartalmaz egy vagy több szeptumot szemben a vad típusú sejtekkel amelyeknek csak 10-20%-a [Garcia és mtsai, 2005]. Az Agn1p túltermelése a sejtek lízisét okozza, ami jelzi, hogy kényes egyensúly áll fenn a sejtfa szintézis és lebontás között [Garcia és mtsai, 2005]. A *Sch. pombe* egy másik génje az *agn2<sup>+</sup>* is 1,3- $\alpha$  glukánáz kódol, de az nem játszik szerepet a sejtszeparációban [Dekker és mtsai, 2004].

Az elsődleges szeptum lebontásában az Eng1p 1,3- $\beta$ -glukanáz vesz részt [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003]. Az *eng1 $\Delta$*  sejtek nem képeznek sejtláncokat, a sejtek négyes

csoportokban vannak, gyengén kapcsolódnak egymáshoz, ami az el nem bontott 1,3- $\beta$ -glukánból adódik [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003]. Ha a *sep1* mutáns hifái mechanikai úton feldarabolódnak, a calcofluorral festődő elsődleges szeptum anyaga idővel eltűnik a másodlagos szeptum felületéről, ami azt jelezheti, hogy az elsődleges szeptum spontán is feloldódik [Sipiczki és Bozsik, 2000]. Az Eng1p a glikozid hidroláz család 81-be tartozik (GH81) [Martin-Cuadrado és mtsai, 2008]. Az ebbe a családba tartozó fehérjék rendelkeznek egy közös 650 bp-nyi régióval, amely tartalmazza a feltételezhető katalitikus domént. A család glukanázai specifikusak a  $\beta$ -1,3 kötésekre. Ezek a szénhidrát aktív enzimek egy katalitikus egységből és egy azt követő egy vagy több szénhidrátkötő egységekből (carbohydrate-binding modules: CBMs) épülnek fel. Az utóbbi képes különféle poliszacharidokhoz kapcsolódni, és az az elsődleges funkciója, hogy növelje a katalitikus hatékonyságot azzal, hogy közelebb hozza a szubsztrátot a katalitikus egységhez. Az Eng1p lokalizációjához a C-terminális végén található domén is szükséges, amely három tandem ismétlődésből álló, szénhidrát-kötő modulként (CBM) viselkedő régió. Ennek a CBM-nek a szekvenciája nem hasonlít a meglévőkhöz, ezért újonnan CBM52-ként írták le [Martin-Cuadrado és mtsai, 2008].

A *Sch. pombe*-ben megtalálható egy másik 1,3- $\beta$  glukanáz, az *eng2*<sup>+</sup>, amelynek deléciója nem okoz sejtszeparációs hibát, tehát feltehetőleg nem vesz részt abban [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003].

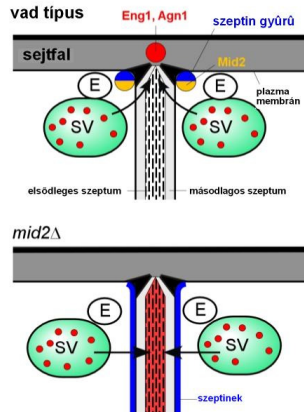
### 2.7.3. A sejtszeparációs enzimek szeptumhoz történő szállítása

Az Agn1p és Eng1p szeptum régióban történő helyes lokalizációjához a Mid2p, szeptinek és a funkcionális exociszta szükségesek (**13. ábra**) [Berlin és mtsai, 2003; Tasto és mtsai, 2003].

A Mid2p az amino terminális részén rendelkezik egy doménnel, amely a *Drosophila* anillinnel mutat nagy hasonlóságot [Tasto, 2003]. Ez a domén az aktinkötésért felelős. [Tasto, 2003]. Az anillinek az emberben is megtalálhatóak. Különböző típusú tumorsejtekben (például mellrák, gyomorrák, melanoma) megfigyelhető az anillinek mRNS szintjének a megnövekedése, melyek termelődése sejtciklus génektől függ [Hall EP és mtsai, 2005]. A Mid2p tartalmaz egy másik ún. plekstrin homológ domént a C-terminális végen, amely a szeptinnel kialakított kapcsolatáért felelős [Berlin és mtsai, 2003]. A másik Mid protein, a Mid1p az aktinyűrű helyes lokalizációjában vesz részt (lásd 2.6. fejezet). A Mid1p sejtmagi lokalizációs szignállal rendelkezik, ez nem található meg a Mid2p-ben [Tasto és mtsai,

2003]. A *Sch. pombe*-ben hétféle szeptint írtak le, ebből négy az osztódási síkban helyezkedik el, három a meiotikus sejtekben a sporulációban játszik szerepet. A *Sch. pombe* szeptinmutánsok életképesek ugyan, de enyhe sejtszeparációs hibával rendelkeznek, ami megegyezik a *mid2Δ* sejtformológiájával [Berlin és mtsai, 2003].

Az exociszta egy multiprotein komplex, amely a Golgi készülékből származó vezikulákat irányítja a célhelyükre, ahol összeolvadnak a sejtmembránnal [pl. Guo és mtsai, 2000]. A *Sch. pombe* exociszta öt alegységből épül fel (Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p és Exo70p) [Wang és mtsai, 2002].



13. ábra

A Mid2p szerepe az Agn1p és Eng1p enzimek helyes lokalizációjában; E: exociszta; SV: szekréciós vakuólum [Martin-Cuadrado és mtsai, 2005].

A sejtszeparáció során először egy nem kontraktilis („összehúzódásra képes”) szeptin-Mid2p (SMR:szeptin-Mid2 ring) gyűrű szerveződik a szeptáció helyén, amely később két részre válik ahogy a szeptum kifejlődik [Berlin és mtsai, 2003; Tasto és mtsai, 2003]. Az SMR, azaz szeptin-Mid2p gyűrű irányítja az exociszta megfelelő helyre történő lokalizációját, amely a szeptális régióba üríti a hidrolitikus enzimeket. Az Agn1p és az Eng1p és a Cfh4p (utóbbi funkciója még nem ismert) egy ún. sejt-szeparációs gyűrűt (CSR: cell separation ring) hoznak létre szekréciójuk után a szeptális régióban [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003; Alonso-Nuñez és mtsai, 2005]. Mind az Agn1p és Eng1p tartalmaznak szignál (jelző) szekvenciákat, amelyek a szekréciójukhoz szükségesek [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003; Dekker és mtsai, 2004].

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. A doktori munka során felhasznált törzsek

##### 1. táblázat

Felhasznált *Sch. japonicus* var. *japonicus*, *Sch. pombe* és *E. coli* törzsek.

Törzs	Genotípus	Származás
<b><i>Schizosaccharomyces japonicus</i> var. <i>japonicus</i></b>		
7-1	Vad típus h <sup>90</sup> (CCY—44-5-1, CBS 354)	Culture Collection of Yeast, Pozsony, Yukava és Maki 1931.
7-252	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup>	Furuya and Niki, 2009
7-258	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup> <i>ace2</i> <sup>Sj</sup> :: <i>ura4</i> <sup>+</sup>	Ebben a tanulmányban készített
7-254	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup> <i>sep1</i> <sup>Sj</sup> :: <i>ura4</i> <sup>+</sup>	Ebben a tanulmányban készített
7-255	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup> <i>eng1</i> <sup>Sj</sup> :: <i>ura4</i> <sup>+</sup>	Ebben a tanulmányban készített
7-260	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup> <i>mid2</i> <sup>Sj</sup> :: <i>kanMX6</i> <i>mid2</i> <sup>Sj</sup> Δ	Ebben a tanulmányban készített
7-256	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup> <i>agn1</i> <sup>Sj</sup> :: <i>kanMX6</i> <i>agn1</i> <sup>Sj</sup> Δ	Ebben a tanulmányban készített
7-257	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup> <i>mid2</i> <sup>Sj</sup> GFP <i>kanMX6</i>	Ebben a tanulmányban készített
	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup> <i>eng1</i> <sup>Sj</sup> GFP <i>kanMX6</i>	Ebben a tanulmányban készített
7-261	<i>mat</i> <sup>Sj</sup> - P2028 <i>ura4</i> <sup>Sj</sup> -D3 h <sup>-</sup> <i>agn1</i> <sup>Sj</sup> GFP <i>kanMX6</i>	Ebben a tanulmányban készített
<b><i>Schizosaccharomyces pombe</i></b>		
0-1	L972 vad típus h <sup>-</sup>	Leupold, 1950
2-1043	<i>ace2</i> Δ <i>ace2</i> :: <i>kanMX4</i> <i>ura4-D18</i> h <sup>-</sup>	Alonso-Nuñez és mtsai, 2005 LE25
2-1401	<i>eng1</i> Δ <i>eng1</i> :: <i>kanMX4</i> <i>ura4-D18</i> <i>leu1-32</i> <i>ade6-M210</i> h <sup>-</sup>	Alonso-Nuñez és mtsai, 2005 YAB14

2-1402	<i>agn1Δ agn1::kanMX4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>+</sup></i>	Alonso-Núñez és mtsai, 2005
2-1403	<i>mid2::ura4<sup>+</sup> leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>-</sup></i>	Petit és mtsai, 2005 KGY3135
2-843	<i>sep1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 h<sup>+</sup></i>	Zilahi et al., 2000
2-1243	<i>leu1-32 h<sup>-</sup></i>	Leupold, 1950 Bern collection
2-1407	<i>sep1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32 h<sup>-</sup></i>	2-843 x 2-1243 keresztezésből
<b>Sch. pombe transzformánsok</b>		
70	<i>ace2::kanMX4 ura4-D18 h<sup>-</sup> (2-1043)+pREP42</i>	Ebben a tanulmányban készített
71	<i>ace2::kanMX4 ura4-D18 h<sup>-</sup> (2-1043)+pREP2-ace2<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
72	<i>ace2::KanMX4 ura4-D18 h<sup>-</sup> (2-1043)+pREP42-ace2<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
73	<i>ace2::kanMX4 ura4-D18 h<sup>-</sup> (2-1043)+pREP82-ace<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
74	<i>eng1Δ eng1::kanMX4 ura4-D18 leu1-32 ade6-M210 h<sup>-</sup> (2-1401)+pREP82-eng1<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
98	<i>eng1Δ eng1::kanMX4 ura4-D18 leu1-32 ade6-M210 h<sup>-</sup> (2-1401)+pREP42-eng1<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
80	<i>agn1Δ agn1::kanMX4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>+</sup> (2-1402)+pREP82</i>	Ebben a tanulmányban készített
81	<i>agn1Δ agn1::kanMX4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>+</sup> (2-1402)+pREP42</i>	Ebben a tanulmányban készített
82	<i>agn1Δ agn1::kanMX4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>+</sup> (2-1402)+pREP2</i>	Ebben a tanulmányban készített
83	<i>agn1Δ agn1::kanMX4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>+</sup> (2-1402)+pREP82-agn1<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
84	<i>agn1Δ agn1::kanMX4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>+</sup> (2-1402) +pREP42-agn1<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített

85	<i>agn1Δ agn1::kanMX4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>+</sup>(2-1402)+ pREP2-agn1<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
86	<i>sep1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32 (2-1407)+ pREP41</i>	Ebben a tanulmányban készített
87	<i>sep1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32(2-1407)+ pREP41-sep1<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
88	<i>sep1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32 (2-1407)+ pREP81</i>	Ebben a tanulmányban készített
90	<i>sep1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32 (2-1407)+ pREP81-sep1<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
94	<i>sep1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32 (2-1407)+ pREP1</i>	Ebben a tanulmányban készített
92	<i>sep1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32 (2-1407)+ pREP1-sep1<sup>Sj</sup></i>	Ebben a tanulmányban készített
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5α	<i>DH5F (φ 80dΔ(lacZ)M15)recA endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>	A. M. Carr, Anglia

### 3.2. A doktori munka során felhasznált plazmidok

#### 2. táblázat

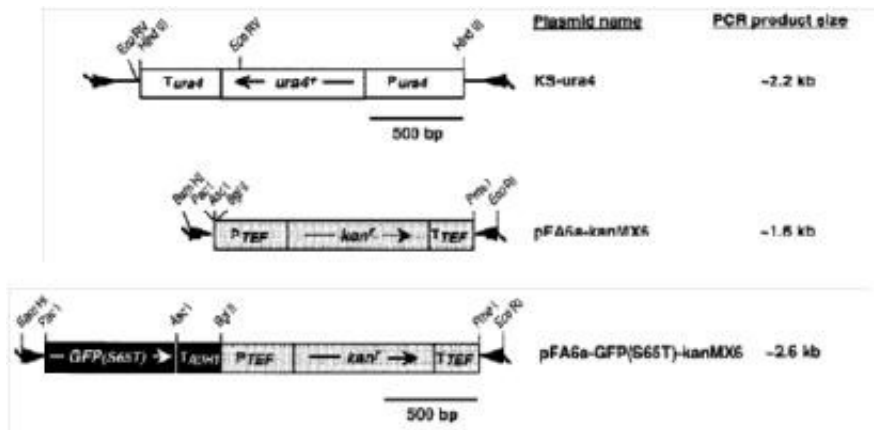
Felhasznált plazmidok neve, leírása és származása.

Név	Leírás	Forrás
pJET 1.2	PCR termékek tompa véggel történő beligálása további klónozáshoz	Clone Jet Kit, Fermentas Cat. Num. K1232
pUC18	<i>Sch. japonicus eng1<sup>+</sup>, ace2<sup>+</sup>, sep1<sup>+</sup></i> gének deléciójához, <i>HindIII</i> helyet kivágtuk	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 20 GenScript Cat.Num SD1162
KS- <i>ura4</i>	<i>Sch. pombe ura4</i> kazettát tartalmaz <i>HindIII</i> helyek között, <i>Sch. japonicus eng1<sup>+</sup>, ace2<sup>+</sup>, sep1<sup>+</sup></i> gének deléciójához	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 126 Bähler és mtsai, 1998

pREP2	Magas fehérje szintet biztosító expressziós vektor <i>Sch. pombe ura4</i> markerrel	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 12 Basi és mtsai, 1993
pREP42	Közepes fehérje szintet biztosító expressziós vektor <i>Sch. pombe ura4</i> markerrel	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 6 Basi és mtsai, 1993
pREP82	Alacsony fehérje szintet biztosító expressziós vektor <i>Sch. pombe ura4</i> markerrel	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 9 Basi és mtsai, 1993
pREP42-EGFP-C	Fehérje C terminálisán GFP-vel jelölő vektor	Craven és mtsai, 1998 Tanszéki plazmidgyűjtemény: 134
pREP42-EGFP-N	Fehérje N terminálisán GFP-vel jelölő vektor	Craven és mtsai, 1998 Tanszéki plazmidgyűjtemény: 135
pFA6a-kanMX6	<i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> és <i>agn1<sup>Sj</sup></i> gének deléciójára használt vektor	Bähler és mtsai, 1998 Tanszéki plazmidgyűjtemény: 299
PFA6a-GFP-kanMX6	<i>Sch. japonicus Mid2p<sup>Sj</sup></i> és <i>Agn1p<sup>Sj</sup></i> , <i>Eng1p<sup>Sj</sup></i> fehérjék GFP jelölésére használt vektor	Bähler és mtsai, 1998 Tanszéki plazmidgyűjtemény: 301
pJET1.2- <i>sep1<sup>Sj</sup></i>	<i>NdeI</i> ; <i>SalI</i> helyek között <i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> gént tartalmazó pJET1.2 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 308 Saját konstrukció
pREP2- <i>sep1<sup>Sj</sup></i>	<i>NdeI</i> ; <i>SalI</i> helyek között <i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> gént tartalmazó pREP2 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 290 Saját konstrukció
pREP42- <i>sep1<sup>Sj</sup></i>	<i>NdeI</i> ; <i>SalI</i> helyek között <i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> gént tartalmazó pREP42 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 285 Saját konstrukció
pJET1.2- <i>ace2<sup>Sj</sup></i>	<i>NdeI</i> ; <i>SalI</i> helyek között <i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gént tartalmazó pJET1.2 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 310 Saját konstrukció
pUC18- <i>ace2<sup>Sj</sup></i>	<i>NdeI</i> ; <i>SalI</i> helyek között <i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gént tartalmazó pUC18 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 297 Saját konstrukció
pREP2- <i>ace2<sup>Sj</sup></i>	<i>NdeI</i> ; <i>SalI</i> helyek között <i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gént tartalmazó pREP2 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 294 Saját konstrukció
pREP42- <i>ace2<sup>Sj</sup></i>	<i>NdeI</i> ; <i>SalI</i> helyek között <i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gént tartalmazó pREP42 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 295 Saját konstrukció

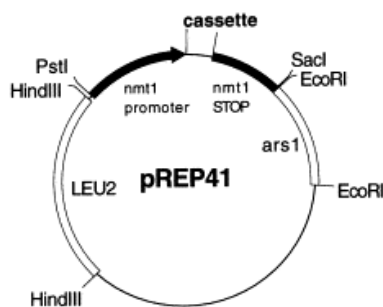
pREP82- <i>ace2</i> <sup>Sj</sup>	<i>NdeI SmaI</i> helyek között <i>Sch. japonicus ace2</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pREP82 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 296 Saját konstrukció
pUC18- <i>mid2</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI</i> helyek között <i>Sch. japonicus</i> (intronos) <i>mid2</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pUC18 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 286 Saját konstrukció
PJET1.2- <i>agn1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI; SmaI</i> helyek között <i>Sch. japonicus agn1</i> gént tartalmazó pJET1.2 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 307 Saját konstrukció
pREP2- <i>agn1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI; SmaI</i> helyek között <i>Sch. japonicus agn1</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pREP2 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 280 Saját konstrukció
pREP42- <i>agn1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI; SmaI</i> helyek között <i>Sch. japonicus agn1</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pREP42 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 281 Saját konstrukció
pREP82- <i>agn1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI; SmaI</i> helyek között <i>Sch. japonicus agn1</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pREP82 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 282 Saját konstrukció
pREP42-EGFP-C- <i>agn1</i>	<i>NdeI; SmaI</i> helyek között <i>Sch. japonicus agn1</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pREP42-EGFP-C vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 283 Saját konstrukció
pUC18- <i>eng1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI</i> helyek között <i>Sch. japonicus eng1</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó <i>HindIII</i> hely nélküli pUC18 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 309 Saját konstrukció
pREP2- <i>eng1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI</i> helyek között <i>Sch. japonicus eng1</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pREP2 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 287 Saját konstrukció
pREP42- <i>eng1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI</i> helyek között <i>Sch. japonicus eng1</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pREP42 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 289 Saját konstrukció
pREP82- <i>eng1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI</i> helyek között <i>Sch. japonicus eng1</i> <sup>Sj</sup> gént tartalmazó pREP82 vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 288 Saját konstrukció
pREP42-EGFP-C- <i>eng1</i> <sup>Sj</sup>	<i>BamHI</i> helyek között <i>Sch. japonicus eng1</i> gént tartalmazó pREP42-EGFP-C vektor	Tanszéki plazmidgyűjtemény: 284 Saját konstrukció





15. ábra

A génkiütéshez és GFP jelöléshez használt vektorok [Bähler és mtsai, 1998].



16. ábra

A pREP41 expressziós vektor [Craven és mtsai, 1998].

A komplementációs vizsgálatokhoz a pREP expressziós vektorsorozatot használtuk, amely különböző mértékű transzkripciót tesz lehetővé a módosított thiamine-represszálható *nmt1*<sup>+</sup> promóterek révén [Maundrell, 1990; 1993]. A pREP1; pREP41; pREP81 sorozat LEU2<sup>+</sup> markert, a pREP2; pREP42; pREP82 sorozat *ura4*<sup>+</sup> markert tartalmaz. A pREP1 és a pREP2 vektorok biztosítják a legerősebb expressziós szintet, a pREP41 és a pREP42 közepeset, míg a pREP81 és a pREP82 a leggyengébb kifejezést teszik lehetővé. A pREP1 és a pREP2 vektorok a vad típusú *nmt1*<sup>+</sup> promótert tartalmazzák, míg a többi módosított TATA box-szal rendelkező változattal rendelkezik [Basi, 1993], amelyhez gyengébben kötődik az RNS polimeráz, ezáltal az expresszió mértéke csökken. Forsburg (1993) kimutatta, hogy ha a pREP1 vektor által megvalósítható expressziót 100%-nak vesszük, akkor a pREP41 ennek az expressziós szintnek a 25%-ára, a pREP81 pedig 7%-ára képes.

### 3.3. A doktori munka során használt primerek

3. táblázat

Felhasznált PCR primerek neve, szekvenciája (5'-3' irányban) és leírása.

Primer neve	Tanszéki plazmid-gyűjtemény sorszám	Primer szekvenciája (5'-3' irányban)	Leírás
Sjapace2F	73.	CCCCATATGATGTC TTTTTCG	<i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához szükséges forward primer <i>NdeI</i> helyel
Sjapace2R	74.	CCC <b>GTCGACT</b> TAAAG CAGCAAG	<i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához szükséges reverse primer <i>SalI</i> helyel
ace2disfor	150.	CCC <b>AAG CTT</b> TGG ATC CTC GAG CCC	<i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gén deléciójához szükséges forward primer <i>HindIII</i> helyel
ace2disrev	151.	GGG <b>AAG CTT</b> ATT ATC CAA TCT CAT	<i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gén deléciójához szükséges reverse primer <i>HindIII</i> helyel
Sjapsep1F	75.	CCC <b>ATA TGA</b> TGA GCA AAA AAA	<i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához szükséges forward primer <i>NdeI</i> helyel
Sjapsep1R	76.	GGG <b>TCG ACT</b> TAG GGA AGG TGG A	<i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához szükséges reverse primer <i>SalI</i> helyel
sep1revTprimer	242	ACT GTT ACA CAT CCA ATC CT	<i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> gén deléciót ellenőrző reverse primer
Sjeng1for	84.	CGG <b>ATC CAT</b> GCT TGT GCC ATT'	<i>Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához szükséges forward primer <i>BamHI</i> helyel
eng1revujBA	97.	CGG <b>ATC CTT</b> ACA GGG CAA TTA	<i>Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához szükséges reverse primer <i>BamHI</i> helyel
eng1revT primer	243	AAG GTT CCA GAC CTA AAG CT	<i>Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup></i> deléciót ellenőrző reverse primer

Sjagn1for	86.	CGG ATC CAT GCT TTG GCT AT	<i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához szükséges forward primer <i>Bam</i> HI helyel
Sjagn1rev	87.	CCC CGG GCT AGA AAA AAC AA	<i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához szükséges reverse primer <i>Sma</i> I helyel
agn1japDfor	244	TCA AGT AGA CAA AGA ACT CAC CAA GTC TTT TAA AGC TAT TTC GGA TTA CTC TCT GGA CTT TTT AGA ATC TAT TCA TCA TAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A	<i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> gén deléciójához használt forward primer
agn1japDrev	245	TTC TTC CAT TTT GAA AGT TGT CAT GTA GAA CCA ATA GAA AGC CAT GCC AGC ACG ACT CTC CAA AAG AAT ACC TTA AAC GTG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C	<i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> gén deléciójához használt reverse primer
agn1forP	246	CGT CGG ATT GCT TAC CTT TG	<i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> géndeléciót ellenőrző forward primer
agn1GFPfor	247	TGG CTT CTG GTA CTG GAC CGG AAA TTA CTT CTT CCA CTG CTT CTT ACA ACT TTA ATG CTT ACA CGG GCC ACT TGT TTT TCC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A	<i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> gén GFP jelöléséhez használt forward primer

Sjmid2for	88.	CGG ATC CAT GGC AGC TAT TT	<i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához használt forward primer
mid2revuj	98.	CGG ATC CCT ACG ATT GGG CAA	<i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> gén felszaporításához használt reverse primer
mid2GFPfor	240	CAC TTC GTA AAC ATC TTG GTC AAT GCT CCA AAG TGA GTA AGA GTT GGA CAA AAG CTT TTC TTA CCA CGG TGG CCC AAT CGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A	<i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> gén GFP jelöléséhez használt forward primer
mid2GFPrev	241	GAT GAG GTT CAC AAA GGT GAG GAG AAA AAA GAC AAA GCT AGG AGC ACA CGA AAC ACA ATA CAG TTT GCC TTG AAC CAG AAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C	<i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> gén GFP jelöléséhez használt reverse primer
Ace2revT	189.	TAA CCG AAA TTA CCG AAA CC	<i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> gén deléció ellenőrző reverse primer
Mid2revT	190.	TTAGTCATCAACAG TAGCAG	<i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> gén deléció ellenőrző reverse primer
SjAgn1Frt	125.	TGCTCCTGTCTCTC CTTGGT	<i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> qPCR forward primer
SjAgn1Rrt	126.	ATGTCAGGCTGCAT GTCAAG	<i>Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup></i> qPCR reverse primer
SjAce2Frt	123.	AACCGGCGTACTTC CTTCTT	<i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> qPCR forward primer

SjAceRrt	124.	AAACTGGCCATTGT TTCAGG	<i>Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup></i> qPCR reverse primer
SjSep1Frt	127.	CTCCGAAATCCATG TGTCTT	<i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> qPCR forward primer
SjSep1Rrt	128.	TCATCGGGGAAAA GAATGAG	<i>Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup></i> qPCR reverse primer
KS-ura4R	233	CACAAGATAGAAT GGATGTT	<i>Sch. pombe ura4<sup>+</sup></i> kazetta ellenőrzéséhez szükséges reverse primer
KS-ura4-Forw	196.	GCCAATGAAAGAT GTATGTAG	<i>Sch. pombe ura4<sup>+</sup></i> kazetta ellenőrzéséhez szükséges forward primer
SJmid2Dfor	191.	ACAGATTGTTTGTG GTTTTGAAATTTT TTATTGACTTTTT GTCCGCTTGCTGC CAATAAACTC TTTAAATTCGTATC GGATCCCCGGGT AATTAA	<i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> delécióhoz forward primer
SJmid2Drev	192.	AAACACAATACAG TTTGCCTTGAACCA GAAGGCAACTGCG AAGAATGAACTTA TGGAAAA ACCCATTGCTAATT CATGCCGAATTTCG AGCTCGTTTAAAC	<i>Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup></i> delécióhoz reverse primer
kanMX6F	201.	TTGGACGAGTCGG AATCGCAG	kanMX6 kazetta ellenőrzéséhez forward primer
kxtest	39.	CCTGATTGCCCCGAC ATTATCGC	kanMX6 kazetta ellenőrzéséhez reverse primer

Agn1GFP fornew	248	TAC TGG ACC GGA AAT TAC TTC TTC CAC TGC TTC TTA CAA CTT TAA TGC TTA CAC GGG CCA CTT GTT TTT CGG TGC TGG AGC AGG TGC TCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA	<i>Sch. japonicus</i> Agn1p <sup>Sj</sup> fehérje GFP jelölő forward primer
Eng1GFPfor	249	CGA GGT GTG TGG AAT TGC TTG TTA TGA CAC GGG TGC TTA CTC GTG CAA TGA AGG TCG TCT AAT TGC CCT GGG TGC TGG AGC AGG TGC TCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA	<i>Sch. japonicus</i> Eng1p <sup>Sj</sup> fehérje GFP jelölő forward primer
Eng1GFPprev	250	GGT TCC AGA CCT AAA GCT TAG GAA ATC CAC CAA AAA GAC CAG GCC AAC AGG CGC GAC AAA AAG GAA AAA CAG AAA AGG GGG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C	<i>Sch. japonicus</i> Eng1p <sup>Sj</sup> fehérje GFP jelölő reverse primer
Sce3RTs	106	GTGACTGGGTTCGT CGTG	<i>Sch. pombe</i> sce3 <sup>+</sup> qPCR-hez használt forward primer
Sce3RTa	107	GGCGCTCAGAGGA TTCAC	<i>Sch. pombe</i> sce3 <sup>+</sup> qPCR-hez használt reverse primer
SjSCE3RTF	197	GTCCGAGGGTGAG ATTACCA	<i>Sch. japonicus</i> sce3 <sup>Sj</sup> qPCR- hez használt forward primer
SjSCERTR	198	GAACTCAACGTAG GCGAAGC	<i>Sch. japonicus</i> sce3 <sup>Sj</sup> qPCR- hez használt reverse primer
SpAGN1RTF1.0	319	CCAGCGTTTCCTCA GACTTC	<i>Sch. pombe</i> agn1 <sup>+</sup> qPCR-hez használt forward primer
SpAGN1RTR1.0	320	GCCCGTGCTAACAT CAGAAT	<i>Sch. pombe</i> agn1 <sup>+</sup> qPCR-hez használt reverse primer

### 3.4. Felhasznált oldatok és tápközegek

#### 3.4.1. Táppoldatok *Sch. pombe* és *Sch. japonicus* számára

#### 4. táblázat

Felhasznált táppoldatok neve, összetétele és felhasználása.

Táppoldat	Összetétel		Felhasználás
YEL (1000 ml) pH 5,2-5,4 [Sipiczki és Ferenczy, 1977]	glükóz	30,0 g	Komplex táppoldat
	Élesztő kivonat	5,0 g	
	Esetleges aminosav, nukleotid bázis kiegészítés (adenin, leucin, uracil, hisztinin, arginin, triptofán)	100 mg	
YEA [Sipiczki és Ferenczy, 1977]	YEL	1000 ml	Komplex táptalaj
	poragar	20,0 g	
YEA+ kanamycin	YEL	1000 ml	Szelektív táptalaj kanamycin rezisztencia génnek kifejeződésének kimutatása transzformálás
	poragar	20,0 g	
	Kanamycin (Sigma)	150/200 mg	
MML (1000 ml)	Glükóz	10,0 g	Minimál
	Yeast Nitrogen Base (Becton Dickinson and Company Sparks, Difco™ USA)	6,7 g	
	aminosav, nukleotid bázis kiegészítés (adenin, leucin, uracil, hisztinin, arginin, triptofán)	100 mg	

MMA	MML	1000 ml	Minimál
	poragar	20,0 g	
EMML (1000 ml) [Mitchison, 1970]	$C_2H_2KO_4$	3,0 g	Minimál
	glükóz	20,0 g	
	$NH_4Cl$	5,0 g	
	$NaHPO_4 \times 12 H_2O$	5,55 g	
	Sóoldat	20 ml	
	Vitaminoldat	1 ml	
	Nyomelemoldat	0,1 ml	
	Esetleges aminosav, nukleotid bázis kiegészítés (adenin, leucin, uracil, hisztinin, arginin, triptofán)	100 mg	
EMMA [Mitchison, 1970]	EMML	1000 ml	Minimál
	poragar	20 g	
EMMA+ thiamine	EMML	1000 ml	Minimál
	poragar	20 g	
	Thiamine (50 mg/l)	1 ml	
SPAS (1000 ml)	$KH_2PO_4$	1,0 g	Spóráztató
	glükóz	10 g	
	vitaminoldat	1 ml	
	Adenin, uracil, leucin, arginin, hisztidin, triptofán	20 mg	
	Desztillált víz	1000 ml	
	poragar	20 g	

### 3.4.2. Tápközegekhez szükséges kiegészítő oldatok összetétele

5. táblázat

Tápközegekhez használt kiegészítések neve, összetétele és felhasználása.

Oldat	Összetétel		Felhasználás
1000 X Vitaminoldat (100 ml)	pantoténsav	0,1 g	EMML, EMMA, SPAS
	nikotinsav	1,0 g	
	inozit	1,0 g	
	biotin	1,0 mg	
50 x Sóoldat (1000 ml)	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	53,3 g	EMMA, EMML
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,735 g	
	KCl	50,0 g	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g	
10 000 x Nyomelemoldat (1000 ml)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,0 g	EMMA, EMML
	MgSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	4,47 g	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,0 g	
	FeCl <sub>3</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	2,0 g	
	MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,6 g	
	KI	1,0 g	
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,4 g	
	Citromsav	10 g	

### 3.4.3. *Escherichia coli* tenyésztéséhez használt tápoldatok

**6. táblázat**

*Escherichia coli* tenyésztéséhez használt tápoldatok neve, összetétele és felhasználása.

Tápoldat	Összetétel		Felhasználás
LB + ampicillin pH7 (1000 ml) [Davis és mtsai, 1986]	Bacto tripton	10 g	Komplex
	Élesztő kivonat	5 g	
	NaCl	10 g	
	Ampicillin (50 mg/ml)	1 ml	
LBA+ ampicillin	LB+amp.	1000 ml	Komplex
	Poragar	20 g	

### 3.4.4. Kísérletekhez használt oldatok

**7. táblázat**

A kísérletek során használt oldatok neve, összetétele és felhasználása.

Oldat	Összetétel		Felhasználás
0,5 M EDTA pH 8,0	EDTA	25,0 g	TE, TBE
	NaOH	186,1 g	
	Millipore MilliQ víz	1000 ml	
1 M TrisHCl pH 8,0	Tris HCl	121,4 g	TE
	Millipore MilliQ víz	1000 ml	
TE (10 mM Tris 1mM EDTA) pH 8,0	0,5 M EDTA	2 ml	gDNS izolálás, plazmid DNS izolálás
	1 M Tris	10 ml	
	Millipore MilliQ víz	1000 ml	
10 % SDS	SDS	10 g	Plazmid DNS izolálás: Lízis oldat
	Millipore MilliQ víz	100 ml	
10 M NaOH	NaOH	40,0 g	Plazmid DNS izolálás: Lízis oldat
	Millipore MilliQ víz	100 ml	
RN-áz oldat (100 µg/ml)	ribonucleaseA 10 mg/ml	100 µl	Plazmid DNS izolálás
	TE	10 ml	

Lízis oldat	10 M NaOH	0,2 ml	Plazmid DNS izolálás
	10% SDS	1 ml	
	Millipore MilliQ víz	8,8 ml	
Neutralizáló oldat pH 5,0	Kálium-acetát	25,03 g	Plazmid DNS izolálás
	Ecetsav	X ml (pH állításhoz)	
	Millipore MilliQ víz	100 ml	
Izopropanol (Sigma)	-	-	gDNS izolálás, plazmid DNS izolálás, RNS izolálás
Lízis puffer	1 M Tris	0,5 ml	gDNS izolálás
	0,5 M EDTA	100 µl	
	5 M NaCl	1 µl	
	Triton	1 µl	
	10% SDS	1 ml	
	Millipore MilliQ víz	44,398 ml	
Lysing enzim oldat	Lysing enzim (Sigma)	5-6 mg	Aszkuszfal oldása keresztezés után
	Millipore MilliQ víz	1 ml	
Carrier DNS 10 mg/ml	Deoxyribonucleic acid degraded free acid from herring sperm (Sigma)	10 mg	Transzformálás
	Millipore MilliQ víz	1 ml	
1 mg/ ml-es DAPI törzsoldat	DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma)	1 mg	Sejtek DAPI festése mikroszkópizáláshoz
	Millipore MilliQ víz	1 ml	

Trisol (Tri Reagent™ (SIGMA))	-		RNS izolálás
Fenol-kloroform (SIGMA)	-		RNS izolálás
95% etil-alkohol (Sigma)			Plazmid DNS izolálás, gDNS izolálás
70% etil-alkohol	100% etil-alkohol (Sigma)	70 ml	Plazmid DNS izolálás, gDNS izolálás
	Millipore MilliQ víz	30 ml	
1,2 M szorbitoldat	Szorbit	218,4 g	Elektroporátoros transzformálás
	Millipore MilliQ víz	1000 ml	
DEPC víz	Dietyl- pirokarbonát (SIGMA)	1 ml	RNS izolálás, cDNS szintézis
	Millipore MilliQ víz	999 ml	
10 X TBE puffer	Tris-HCl	109,0 g	Gélelektroforézis
	Bórsav	55,6 g	
	0,5 M EDTA	40 µl	
	Millipore Milli Q víz	1000 ml	
1%-os agaróz	Agaróz	10 g	Gélelektroforézis
	1 x TE	1000 ml	

0,1 M CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	1,11 g	<i>E. coli</i> transzformálás
	Millipore MilliQ víz	100 ml	
Fenol-kloroform (SIGMA)			RNS izolálás
3 M Na-acetát	Na-acetát	24,609 g	gDNS izolálás
	Millipore MilliQ víz	100 ml	
25 mM EDTA-DEPC	0,5 M EDTA	50 µl	RNS izolálás
	DEPC-es víz	950 µl	
100 x calcofluor törzsoldat (3,5 mg/ µl-µg/ml)	Calcofluor White (C <sub>40</sub> H <sub>44</sub> N <sub>12</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> , Fluorescence Brightener 28, Sigma F3543)	35 mg	Sejtek calcofluor festése mikroszkópizáláshoz
	10 M NaOH	5 µl	
	Millipore MilliQ víz	10 µl	

### 3.5. Molekuláris biológiai módszerek

#### 3.5.1. Genomiális DNS izolálás *Sch. japonicus*-ból üvegyöngyös módszerrel

A *Sch. japonicus* törzset egy éjszakán át tartó 30°C-on YEL tápoldatban történő tenyésztés után (10-50 ml) lecentrifugáltuk 4000 rpm-mel 10 percig. A felülúszó eltávolítása után a sejteket mostuk vízzel, átvettük őket 2 ml-es Eppendorf csőbe és újra lecentrifugáltuk 5 percig 4000 rpm-mel. A felülúszót leöntöttük és 0,2 ml lízis puffert, 0,2 ml fenol-kloroformot és 0,3 gramm üvegyöngyöt mértünk a sejtekhez és 4 percig vortexeltük (kevertettük) az Eppendorfokat. Majd 0,2 ml TE puffert mértünk az Eppendorf csövekbe, és 4000 rpm-mel 5 perc alatt lecentrifugáltuk őket. A felső vizes fázist átmértük másik Eppendorf csőbe és 1 ml abszolút etanolt adtunk hozzá. 10 percig -20 °C- on tartottuk a mintákat, majd lecentrifugáltuk őket 4000 rpm-mel 5 percig, és a felülúszót eltávolítottuk. 1 ml 70%-os etanolt adtunk a mintákhoz és újra lecentrifugáltuk őket 4000 rpm-mel 5 percig. Az üledékhez 400 µl TE puffert és 3 µl 10 mg/ml RN-áz oldatot mértünk, és 37 °C-on

inkubáltuk a csöveket 15-20 percig, amíg az enzim elbontja az RNS-t. 20 perc elteltével 40 µl 3 M nátrium-acetáttal és 1 ml abszolút alkohollal kicsaptuk a DNS-t, majd 10 percig -20 °C- on inkubáltuk a mintákat. 10 000 rpm-mel 2 percig centrifugáltuk a csöveket, és az üledéket megszárítottuk lamináris fülkében. 25-50 µl TE-ben vettük fel a gDNS-t, tárolása -20 °C- on történt.

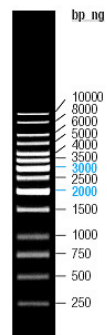
### 3.5.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A munkánk során többféle PCR paramétert és enzimet használtunk a céljainknak megfelelően. A reakcióknál figyelembe vettük a primerek  $T_m$  pontját, és ez alapján választottuk meg az annealing (primer kapcsolódási lépése) hőmérsékletet. A reakciókhoz MJ Research Minicycler PTC 150 vagy ABI 2720 Thermalcycler készülékeket használtunk. Az adott reakciónál használt enzime, és PCR paraméterekre az eredmények fejezetben mindenhol kitérek.

A PCR reakcióhoz általában a következőket mértük össze (az esetleges eltéréseket az eredmények fejezetben külön leírom): 1 µl gDNS-t (kb. 1 µg), 1-1 µl 10 µM forward és reverse primert, 5 µl 10X PCR reakció puffert, 2 µl 5 µM dNTP-t, 1 µl PCR enzimet, és a PCR elegyet MQ vízzel 50 µl-re egészítettük ki.

### 3.5.3. Gélelektroforézis

A módszer ismertetése Sambrook és mtsai, 1989-es leírása alapján történik.



**17. ábra**

Az agaróz gélelektroforézisekhez használt DNS létra (Fermentas).

TBE-t használtunk futtatópufferként, a futtatásokat 1% agaróz gélen (gélből való visszaizoláláshoz 0,7%-ost használtunk), 1 órán keresztül, 100 mV-on végeztük. A DNS-t ethidium-bromiddal (SIGMA) tettük láthatóvá UV fényel megvilágítva. A futtatások során 1 kb-os DNS markert (Fermentas) használtunk. A markeren a következő DNS szakaszok láthatóak: 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4000 bp, 3500 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp (**17. ábra**). A minták festéséhez a futtatáshoz 6X loading dye-t (Fermentas) használtunk.

#### **3.5.4. Restriktációs enzim emésztés**

Összemértük Eppendorf csőbe a következő reakcióelegyet: 10 µl DNS (1-2 µg); 4 µl 10x reakció puffer (Fermentas); 0,5 µl restriktációs enzim (Fermentas); 25,5 µl desztillált víz. Az inkubálás 1,5 órán keresztül 37 °C-os vízfürdőben történt.

#### **3.5.5. Ligálás**

A munkánk során többféle ligálást is végeztünk. A pJET1.2. vektorba történő ligálás során magát a vektort tartalmazó CloneJET™ kit utasításait követtük. Mivel a géneket Pfu enzimmel szaporítottuk fel, a ligálások tompa véggel történtek.

A többi ligálás általánosságban a következőképpen történt, az esetleges eltérésekre az eredmények fejezetben külön kitérek. A vektorok előkészítése során először restriktációs enzim emésztés történt, majd a Calf Intestine Alkaline phosphatase-zal (Fermentas) defoszforiláltuk őket, az önmagukkal való összeligálódás elkerülése végett. Az enzim a restriktációs endonukleáz pufferjében is működik, ezért közvetlenül az emésztéshez mértük hozzá az 1 µl foszfátot, és inkubáltuk 37 °C-on 30 percig. A reakció leállítása 85 °C-on 15 percig tartó inkubálással történt. A ligálandó fragmentum előkészítése szintén restriktációs enzim emésztést jelent (vektor, PCR fragmentum). A ligálásokhoz a következő reakcióelegyet mértük össze: 1 µl vektor (5-10 ng), 9 µl fragmentum (45-90 ng), 2 µl 10x T4 ligáz puffer (Promega), 7 µl nukleáz mentes víz, 1 µl T4 DNS ligáz (Promega). Az elegyet vortexeltük, és pár másodpercig centrifugáltuk. A ligálás egy éjszakán át 4 °C-on történt, másnap a ligátumot DH5α kompetens *E. coli* sejtekbe transzformáltuk a 3. 5. 7. fejezet leírása alapján. A transzformált telepek egy éjszakán át tartó 37 °C-os inkubálás után jelentek meg az ampicillint tartalmazó LB táptalajos csészéken.

### 3.5.6. Élesztő transzformálás elektroporátorral

A transzformálandó sejteket (*Sch. pombe*, *Sch. japonicus*) egy éjszakán át tenyésztettük 100 ml YEL komplex tápoldatban, 30°C-on 200 rpm-mel történő rázatás mellett. Másnap OD<sub>590</sub> méréssel állapítottuk meg a sejtek sűrűségét. Tapasztalataink szerint az OD<sub>590</sub> 0,4-0,6 érték között a legnagyobb a sejtek transzformálhatósági hatékonysága. Ekkor lecentrifugáltuk a sejteket 4000 rpm-mel 5 percig 4 °C-on, majd átvettük őket Eppendorf csőbe 1ml 1,2 M-os hideg szorbittal felszuszpendálva. 4000 rpm-mel 5 percig 4 °C-on ismét lecentrifugáltuk őket, a felülúszót eltávolítva még kétszer megismételtük ezt a 1,2 M-os szorbittal történő mosást. Az utolsó centrifugálást követően 200 µl 1,2 M-os szorbiban vettük fel a sejteket. Hozzáadtunk a csövekhez 1 µl carrier DNS-t (10 ng/µl-es törzsoldat), és a transzformáló DNS-t (kb. 1 µg-ot a DNS koncentrációtól függően 5-10 µl). Előre hűtött küvétákba (2mm) mértük a sejteket és a Bio Rad Micropulser™ Electroporation Apparatus ShS (2,3 kV feszültség, 25µF kapacitás, 200Ω ellenállás, 5msec időtartam) programjával elvégeztük az elektroporációt. Az elektroporációt követően azonnal 1 ml 1,2 M-os jéghideg szorbitot mértünk a küvétába. 200 µl-enként szélesztettük a sejteket EMM vagy YNB szelektív táptalajokra. 30°C-on inkubálva 5-6 nap múlva jelentek meg az első transzformált élesztő telepek.

### 3.5.7. *E. coli* transzformálás

A módszer leírása Sambrook és mtsai (1989) leírása alapján történik. Összemértünk Eppendorf csőben 10 µl DH5α *E. coli* kompetens sejtet és 90 µl jéghideg 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-ot. Ehhez adtuk a transzformálandó DNS-t (általában 10 ng). Ligátumból kb. 5 µl-t. Hősokk lépés következett 90 másodpercig 42 °C –on. 2 percre jégre tettük a csövet. Hozzáadtunk 900 µl LB tápoldatot és 1 órára 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük az Eppendorf csöveket. 300-300 µl-enként szélesztettük ampicillines LB táptalajra. 37 °C –ra helyeztük a Petri csészéket egy éjszakára, másnapra kinőttek a transzformált baktériumtelepek.

### 3.5.8. Plazmid DNS izolálás *E. coli* sejtekből: Mini preparátum

A módszer kifejtése Sambrook és mtsai (1989) alapján történik. 6 ml ampicillin tartalmú LB tápoldatba leoltottuk a transzformált baktériumtelepeket, s egy éjszakán át inkubáltuk őket 200 rpm-en 37 °C –on. A tenyészetből 2 ml-t átpipettáztunk Eppendorf csőbe, lecentrifugáltuk 1 percig 13000 rpm-en. A felülúszót leöntöttük, és a pelletet

felszuszpendáltuk 300 µl 100 µl/ml RN-áz tartalmazó 1x TE pufferben. Hozzáértünk 300 µl lízis oldatot, óvatosan forgatva összekevertük, és 5 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten. 300 µl neutralizáló oldatot mértünk hozzá, óvatos forgatással elkevertük, majd 10 percre jégre tettük. 10 perc 13000 rpm 4 °C centrifugálás után a felülúszót (kb. 850 µl) új Eppendorf csőbe pipettáztuk, majd ismét 5 perc 13000 rpm 4 °C centrifugálás következett. A felülúszót új Eppendorfba pipettáztuk (kb. 400 µl) és hozzáértünk 2,5 x térfogatban (1 ml) jéghideg 95%-os etanol. Forgatással elkevertük és 15 percig jégre tettük a csöveket. 5 perc 13000 rpm 4 °C centrifugálás következett. 70%-os etanollal mosást és 13000 rpm (4 °C) centrifugálást végeztünk. A felülúszót eldobtuk, a pelletet lamináris fülkében szárítottuk. Miután megszáradt, 20-50 µl TE pufferben felvettük a pelletet és 4 °C-on tároltuk.

### **3.5.9. RNS izolálás**

A fejezet ismertetése Chomcynsky és Sacchi (1987) leírása alapján történik. A sejteket egy éjszakán át tartó 30°C-on 200 rpm-mel történő tenyésztés után lecentrifugáltuk 4000 rpm-mel 4 °C-on, majd DEPC-es vízzel történő mosást követően ismét lecentrifugáltuk őket 4000 rpm-mel. A DEPC-es víz etárolítása után a sejteket minimum egy napra -70 °C-ra raktuk. 1 nap múlva 750 µl Trisol reagenst és 75 µl fenol-kloroformot adtunk a sejtekhez, vortexeltük és 5 percre jégre helyeztük őket. 15 percig 4 °C-on 12000 rpm-mel történő centrifugálás után, a felső fázist másik Eppendorfba pipettáztuk. 500 µl 2-propanolt hozzáadva vortexeltük a csöveket, majd 15 percre jégre helyeztük őket. 12000 rpm-mel 4°C-on 10 percig centrifugáltuk a sejteket, majd 1 ml 70%-os alkohollal történő mosást követően, ugyanezekkel a paraméterekkel ismét centrifugáltuk őket. A felülúszó eltávolítása után jégen, lamináris fülke alatt szárítottuk meg a pelletet, megszáradása után 15-30 µl DEPC-es vízben vettük fel. A minta -70°C-on 1 hónapig tárolható.

### **3.5.10. RNS minta DN-áz kezelése**

5 µl RNS mintához 1 µl DN-áz puffert (Promega), 1 µl RN-áz inhibitort (Promega), 1 µl DN-áz enzimet (Promega) adtunk, és 37 °C-on inkubáltuk a csövet 30 percig. 1 µl 25 mM EDTA-DEPC-et adtunk a csövekhez és 10 percig 60 °C-on inaktiváltuk a DN-áz enzimet.

### 3.5.11. cDNS szintézis reverz transzkripcióval

A reverz transzkripciót Improm II reverz transzkriptáz rendszerrel (Promega A3802) végeztük. Körülbelül 1 µg RNS-t használtunk fel templátként, melynek előzőleg meghatároztuk a koncentrációját nanodroppal (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer). A reakciókhoz használt készülék MJ Research Minicycler PTC 150. A cDNS szintézise két lépésben történt:

1. Egy PCR csőben összemértük a 2 µl reverz primert (5 µM-os törzsoldatból) + 1 µl RNS-t (x µl) + DEPC-es vizet (10-2-x µl) tartalmazó reakcióelegyet. Ezt 70 °C-on 5 percig inkubáltuk, és utána azonnal jégre helyeztük.

2. A 10 µl-es, az 1. lépésben elkészített reakcióelegyhez a következőket adtuk: 1 µl reverz transzkriptázt, 4 µl reakció puffert, 0,8 µl 0,5 M dNTP mixet és 0,6 µl RN-áz inhibitor (Promega N2111). A PCR csövet PCR készülékbe helyeztük, ahol 10 percig 40 °C-on majd 80 percig 50 °C-on inkubáltuk. Felhasználásig -20 °C-on tároltuk a cDNS-t.

### 3.5.12. Kvantitatív real time PCR

A génexpressziós vizsgálatokhoz a BioRad iQ5 készüléket használtuk. Az eredményeket a *Sch. japonicus* és *Sch. pombe sce3<sup>+</sup>* háztartási gén expressziós szintjére normalizáltuk, és legalább két különböző biológiai minta cDNS-ét (RNS-ét) használtuk fel. Templátként a standard görbe elkészítésének esetében L972 h<sup>-</sup> vad típusú *Sch. pombe* és vad típusú *Sch. japonicus* gDNS-ével dolgoztunk. Minden más esetben a vizsgálandó élesztőtörzsből előállított cDNS szolgált templátként. Triplikátumokkal dolgoztunk és a standard görbéket két párhuzamos, négyelemű tízszeres hígítási sor eredményeiből képeztük.

A reakció paraméterek valamennyi reakció esetében a következők voltak: 12,5 µl SYBR Green Supermix (Bio-Rad 70-8882) reagens, 0,05-0,05 µl forward és reverz primerek (100 µM törzsoldatból, 0,2 µM végkoncentrációban), 4 µl cDNS templát és 8,4 µl MQ víz. A reakciók körülményei a következők voltak: 1. lépés: 95 °C, 5 perc; 2. lépés: 40 ciklus 95 °C, 30 másodperc; 57 °C, 30 másodperc; 72 °C, 30 másodperc; 3. lépés: 72 °C, 5 perc. Továbbá olvadási görbéket (melt curve) is felvettünk, annak ellenőrzésére, hogy csak kizárólag megfelelő termékek keletkeztek. Ennek az előző reakciót követő lépései a következők voltak: 4. lépés: 95 ciklus (10 másodperc minden ciklus) 48 °C -ról indulva 95 °C-ig, 0,5 °C-os hőmérséklet emeléssel minden ciklusban.

A kapott eredményeket a Bio-Rad iQ5 Optical System 2.0 verziószámú szoftverével értékeltük ki.

### **3.6. Genetikai módszerek**

#### **3.6.1. Plazmidvesztéses kísérlet**

Arra szolgál, hogy bebizonyítsuk, hogy a transzformánsok valóban tartalmaznak plazmidot. A transzformánsokat kiszélesztettük a szelektív minimál EMMA táptalajról komplex YEA táptalajra. Ezen egyedi telepek nőttek ki. A kinőtt telepeket átreplikáztuk EMMA táptalajra majd egy-két napig 30 °C-on inkubáltuk a csészét. Ha voltak olyan telepek, amelyek nem nőttek ki az EMMA táptalajon, akkor plazmidvesztést állapítottunk meg, tehát a transzformánsok tartalmazták a plazmidot. A komplex táptalajon néhány sejt elveszíti a plazmidját, mert a táptalaj tartalmazza az aminosavat, vagy nukleotidbázist, és így nincs szüksége a szelekciós markert tartalmazó plazmidjára. Miután visszakerül minimál táptalajra, plazmid nélkül nem tud nőni, mert nem rendelkezik a szelekciós markerrel.

#### **3.6.2. Törzsek keresztezése**

Akkor van rá szükség, amikor két vagy több tulajdonságot, amelyek külön törzsekben találhatóak meg (többnyire auxotrófiát) szeretnénk egy törzsbe bevinni. A két törzset egy Eppendorf csőben kevés vízben összekevertük, majd spóráztató táptalajra (SPAS) csepegtettünk belőle egy pénzérmének megfelelő méretű cseppeket. 2 nap múlva lemostuk a táptalajról az aszkuszokat, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten kezeltük őket 5-6 mg/ml koncentrációjú lysing enzim oldattal. A kiszabadult spórákat Bürker kamrában számoltuk meg, hígítottuk őket úgy, hogy szélesztéskor kb. 100 spóra kerüljön egy szelektív csészére. Minimál táptalajon csak azok a sejtek nőttek ki, melyekben nincs auxotrófia. A létrejött telepeket vizsgáltuk, hogy tartalmazzák-e az adott tulajdonságokat, amelyeket szerettünk volna egy törzsben létrehozni.

### **3.7. Mikroszkópos vizsgálati módszerek**

A mikroszkópos vizsgálatok Nikon eclipse 90i (Instituto de Biología Funcional y Genómica/CSIC Universidad de Salamanca), Olympus BH-2 és DX-40, a 3D mikroszkópia Delta Vision mikroszkóppal (Instituto de Biología Funcional y Genómica/CSIC Universidad

de Salamanca) készültek. A képeket Olympus DP-70 fényképezőgéppel készítettük és a hozzá tartozó programmal dolgoztuk fel.

A mikroszkópos vizsgálatokhoz a sejtek egyaránt lehetnek folyékony tápoldatban és szilárd táptalajon tenyésztve, amelyek lehetnek YEL, YEA, EMM, EMMA, YNB típusú tápközegek. Az adott tenyésztési körülményekre az eredmények fejezetben mindenhol külön kitérek.

### **3.7.1. DAPI festés**

A módszert Moreno és mtsai (1991) leírása szerint alkalmaztuk. Az 1 mg/ml-es DAPI törzsoldatot MilliQ vízzel 100x-ára hígítottunk. 10 µg/ml-es oldatot kaptunk. A sejteket mostuk desztillált vízzel, centrifugáltuk 4000 rpm-mel 2 percig és 70% (v/v) etanolban vettük fel őket 30 percre. Az oldathoz 10 µg/ml-es DAPI oldatot adtunk 20 x-os hígításban. Tárgylemezre 3 µl festett sejtet cseppentettünk és fedőlemezzel lefedve vizsgáltuk őket fluoreszcens mikroszkóppal.

### **3.7.2. Calcofluor festés**

A módszer leírásához Moreno és mtsai (1991) cikkét használtuk fel. A sejteket centrifugáltuk 3500 rpm-mel 5 percig. A pelletből 3 µl-t összekevertünk 0,1-0,5 µg/ml végkoncentrációban calcofluorral. A sejtek tárgylemezre kihelyezve fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálhatóak voltak.

### **3.7.3. Sejtek és hifák morfológiai vizsgálata**

A vizsgálat MMA szilárd táptalajon történt (YNB with amino acids és leucin, adenin, uracil, hisztidin tartalmú) egy éjszakán át tartó 25 °C-on történő inkubálás után (ezen a hőfokon lassabban nőnek). A minimál táptalaj alkalmasabb mikroszkópi vizsgálatokhoz, kevesebb zavaró tápanyagkomponenst tartalmaz, mint a komplex. A Petri csészébe tárgylemezt helyeztünk, és olyan vékonyan öntöttük a táptalajt, hogy a fedőlemezt éppen elfedte. Erre szélesztettük ki a sejteket, amelyekből előzőleg egy kacsnyit eloszlattunk folyékony MML tápoldatban. Szélesztés után megvártuk, míg a sejtszuspenzió megszárad a táptalajon, és egy lángon áthúzott fedőlemezt helyeztünk rájuk. Így a sejtek egy rétegben nőttek, amely megkönnyítette mikroszkópos vizsgálatukat.

A hifákat is hasonló módon vizsgáltuk. Itt a sűrű sejtszuszpenzióból 2-3 µl-t cseppentettünk a tárgylemezre. A cseppek beszáradása után lángon áthúzott fedőlemezt helyeztünk a cseppekre. 30 °C-on 8-10 nap után megjelentek a hifák, amelyek invazív hifák voltak, és egy rétegben nőttek, így könnyebben vizsgálhatóak mikroszkópban. A mikroszkópos képek készítése során, ahol tudtunk fáziskontrasztot használtunk, de mivel a hifák sokszor egymás felett és alatt is nőnek a táptalajban, ezért nehéz mindig jó minőségű fáziskontrasztos képet készíteni. Ebben az esetben fénymikroszkópos felvételeket készítettünk. A hifadarabolódás vizsgálata úgy történt, hogy a már kialakult hifák elé lyukat fúrtunk az agarba és 2-3 µl YEL tápoldatot cseppentettünk bele.

#### **3.7.4. Mikroszkópikus time-lapse (“folyamat-követés”) analízis**

Az előző 3.7.3. fejezetben leírt Petri csészéket használtuk YEA táptalajjal. Leoltás után leégetett fedőlemezt helyeztünk a sejtekre és vizsgáltuk őket mikroszkópban. 10 percenként készítettünk fényképet az osztódó sejtekről.

### **3.8. Bioinformatikai módszerek**

A *Sch. pombe* Sep1p, Ace2p, Agn1p, Eng1p, Mid2p fehérjéihez hasonló *Sch. japonicus* fehérjék szekvenciáit tblastp (NCBI. adatbázis) programmal kerestük meg. A Broad Institute honlapján is megtalálhatóak a *Sch. japonicus* genomszekvenálásából származó adatok, melyeket számítógéppel annotáltak. A szekvenciák globális illesztését az NCBI adatlapján elérhető Needleman-Wunsch globálisan összehasonlító algoritmusával végeztük (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A globális illesztés teljes hosszukban összehasonlítja a két szekvenciát üres helyek ún. gap-ek behelyezésével. Nem ad teljes képet a két szekvencia valós hasonlóságáról, ugyanis a hasonló funkciókra az azonos fehérjeszekvenciák ún. domének megléte adhat magyarázatot, amelyet szekvenciák lokális illesztésével lehet megállapítani. A lokális illesztés a szekvenciák egyes régióit hasonlítja össze, keresvén a nagy hasonlóságú doméneket. A lokális illesztésekhez a NCBI adatbázis Blast bl2seq algoritmusát használtuk. A Blastp algoritmussal kerestünk a szekvenciában konzervatív doménokat. A BLAST program az alapértelemezett BLOSUM 62 szubsztitúciós mátrixot használta az elemzések során.

### 3.9. Egyéb módszerek

#### 3.9.1. Vákuumcentrifugálás

A vákuumcentrifugáláshoz UNIVAPO 100 (UNI EQUIP) centrifugát és hozzá tartozó UNIJET II. REFRIGERATED ASPIRATOR (UNI EQUIP) vizes vákuumkészítő rendszert használtunk. A transzformáláshoz megfelelő töménységű DNS előállításához alkalmaztuk. 150 µl mintát kb. 40 perc alatt töményítettünk 20-30 µl-re.

#### 3.9.2. Szedimentációs kísérlet

A kísérlet ismertetése Dekker és mtsai (2004) cikkében megjelent módszer alapján történik. Az általunk létrehozott *Sch. japonicus* mutánsokat YEL-ben, illetve MML-ben (Yeast nitrogen base with amino acids, leucin, uracil, hisztidin, adenin) tenyésztettük 200 rpm-mel rázatva 28 °C-on egy éjszakán át. Az *Sch. pombe ace2<sup>+</sup>* komplementációs kísérletben pedig EMMML-ben tenyésztettük a pREP-pel transzformált és kontroll törzseket (vad típus, *ace2Δ Sch. pombe*) az uracil auxotrófia miatt, 200 rpm-mel rázatva 30 °C-on egy éjszakán át.

Másnap megmértük CO75colorimeter (WPA) fotometriás készülékkel  $\lambda_{590}$ -en a sejtenyészetek abszorbanciáját, ami 1-1,5 értékek között volt. Azzal a tápoldattal, amiben tenyésztettük a sejteket, beállítottuk a tenyészetek sűrűségét  $OD_{590}=1$ -re. Minden törzsnél 3 párhuzamos mérést végeztünk. Az első mérés előtt a tenyészeteket felráztuk. 2 percenként mértük az egyes törzsek  $OD_{590}$  értékét. A mérés végén megállapítottuk azt az időtartamot, amely alatt az adott törzs, eredeti 1  $OD_{590}$  értéke a 80%-ára illetve 50%-ára csökkent. A kapott adatokat ábráztuk grafikonon Microsoft Excel program segítségével.

#### 3.9.3. Sejtszámlálás

A mikroszkópi képek alapján megszámláltuk az általunk létrehozott *Sch. japonicus* mutánsokban az egyedi sejtek, két szeptummal rendelkező sejtpárok, illetve több szeptumos sejtláncok arányát a vad típusú törzshöz viszonyítva. Azokat a sejteket vettük figyelembe, amelyekben teljes szeptum található. A különböző típusú sejtek arányát ábráztuk grafikonon Microsoft Excel program segítségével. Minden egyéb statisztikai műveletet (pl kétmintás egyfarkú t-próba; 4.4.2.4. fejezet) is ezzel a programmal végeztünk.

## 4. Eredmények és megbeszélésük

### 4.1. A *Sch. pombe* sejtszeparációs gének lehetséges ortológjainak azonosítása és szekvenciaelemzése a *Sch. japonicus* genom-szekvenciájában

#### 4.1.1. A *Sch. pombe* sejtszeparációs génjeinek azonosítása a *Sch. japonicus* genom-szekvenciájában

A *Sch. pombe* sejtszeparációs génjeinek feltételezhető homológjait a *Sch. japonicus*-ban az NCBI adatbázisban [lásd 3.8. fejezet] Blast kereső szolgáltatása segítségével kerestük meg. A kereséshez nem a gének nukleotidszekvenciáját, hanem a géntermékek aminosavsorrendjét használtuk. A legnagyobb hasonlósági értékeket mutató találatokat az **8. táblázat** tartalmazza.

#### 4.1.2. A *Sch. japonicus* feltételezhető sejtszeparációs fehérjéinek szekvencia-elemzése

Valamennyi azonosított *Sch. japonicus* aminosavszekvenciát összehasonlítottuk a *Sch. pombe* aminosavszekvenciákkal globális és lokális illesztési programokkal. A globális illesztéssel arra kerestük a választ, hogy a fehérjék teljes hosszúságát figyelembe véve, milyen mértékű a hasonlóság a fehérjék között. A lokális illesztéssel a konzervált régiókat és a funkció szempontjából valószínűleg fontos doméneket igyekeztünk megtalálni. Globális illesztéshez a Needleman-Wunsch algoritmust használtuk. A globális illesztéssel kapott hasonlósági eredményeket a **8. táblázat** tartalmazza. A lokális illesztéshez az NCBI adatbázisnál elérhető bl2seq nevű blast algoritmust vettük igénybe. A kapott hasonló régiókra vonatkozó eredményeket a **9. táblázat** tartalmazza.

Az „azonosság” a két szekvenciában megtalálható azonos aminosavak százaléka a teljes fehérjeszekvenciára vonatkoztatva. A pozitív aminosavak a nem azonos, de hasonló karakterű aminosavakat jelenti (savas, bázikus, poláros, apoláros, aromás). Az E (expect value) mutatja annak a valószínűségét, hogy az adott adatbázisban a találat homológia (hasonlóság) a véletlen műve legyen. Egynél nagyobb szám esetén a kimutatott hasonlóságnak nincsen semmi jelentősége.  $1 \times 10^{-10}$  és  $1 \times 10^{-50}$  E érték között már szignifikáns homológiáról beszélhetünk [NCBI, glossary].

### 8. Táblázat

A *Sch. pombe* sejtseparációs gének által kódolt fehérjék valószínű megfelelői a *Sch. japonicus*-ban és a hasonlóság a két teljes fehérjére vonatkoztatva Needleman-Wunsch algoritmussal vizsgálva.

<i>Sch. pombe</i>		<i>Sch. japonicus</i>		Teljes fehérjék közötti hasonlóság	
Fehérje	Gén	Fehérje	Gén	Azonosság (%)	Pozitív aminosavak (%)
Sep1	<i>sep1</i> <sup>+</sup> (SPBC4C3.12)	Sep1p <sup>Sj</sup>	SJAG_03143.2	29	44
Ace2	<i>ace2</i> <sup>+</sup> (SPAC6G10.12c)	Ace2p <sup>Sj</sup>	SJAG_02252.2	31	44
Eng1	<i>eng1</i> <sup>+</sup> (SPAC821.09)	Eng1p <sup>Sj</sup>	SJAG_00667.2	57	72
Agn1	<i>agn1</i> <sup>+</sup> (SPAC14C4.09)	Agn1p <sup>Sj</sup>	SJAG_03444.2	73	84
Mid2	<i>mid2</i> <sup>+</sup> (SPAPYUG7.03c)	Mid2p <sup>Sj</sup>	SJAG_00118.2	43	59

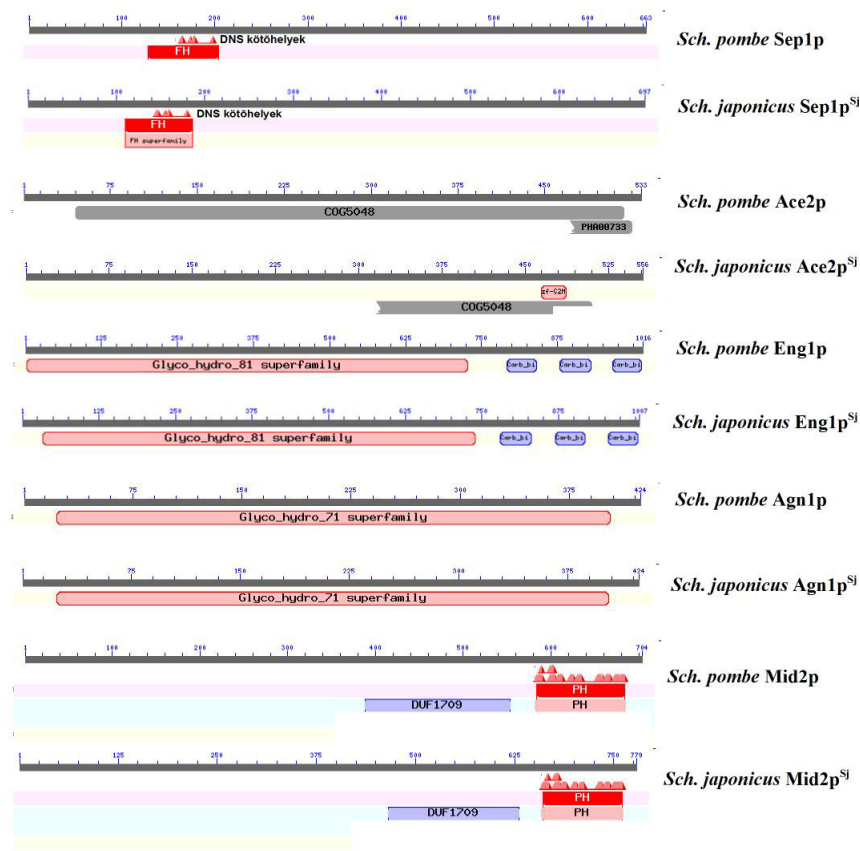
### 9. Táblázat

Hasonló régiók a *Sch. pombe* és a *Sch. japonicus* fehérjeszekvenciákban BLAST programmal vizsgálva.

Összehasonlított fehérje			Hasonló régiók				
Név	Fehérjék hossza (aminosav)		Régiók a <i>Sch. japonicus</i> fehérjében	Hasonlóságuk a <i>Sch. pombe</i> régiókkal			
	<i>Sp</i>	<i>Sj</i>		Régiók a <i>Sch. pombe</i> -ben	Azonosság (%)	Pozitív aminosavak (%)	E érték
Sep1p	663	697	8-199	75-217	48	56	7x10 <sup>-49</sup>
			453-535	453-535	40	59	9x10 <sup>-15</sup>
			660-690	102-132	25	51	5.7
			424-456	549-581	21	48	8.3
			591-611	331-347	57	61	9.0
Ace2p	533	556	406-525	414-533	70	84	5x10 <sup>-38</sup>
			71-164	80-170	33	48	0.019
			340-381	287-327	34	50	0.23
			54-67	236-249	36	50	8.6
Eng1p	1016	1007	5-1006	4-1015	57	72	0,0
			782-831	967-1016	50	58	2x10 <sup>-10</sup>
Agn1p	424	424	1-424	1-424	73	84	0,0
Mid2p	704	779	18-768	14-701	43	60	4x10 <sup>-165</sup>

A bl2seq algoritmussal azonosított konzerváltnak tűnő szakaszok között lehetnek olyanok, amelyek funkcionális doméneknek felelnek meg. Ennek tisztázása érdekében az NCBI adatbázis blastp algoritmusát használtuk fel, amely kimutatja, hogy egy fehérje tartalmaz-e ismert doménnek megfelelő szekvenciát. Az eredmények az **18. ábrán** láthatóak.

A *Sch. japonicus* és *Sch. pombe sep1<sup>+</sup>* génjében található egy fork-head DNS-kötő domént kódoló rész mindkét szekvencia elején (A **18. ábrán** FH-val jelölve). Az *ace2<sup>+</sup>* génekben megtalálható egy cink-ujj domént kódoló szakasz mindkét fajban (**18. ábrán** COG5048 jelű, szürkével jelölve). Az *eng1<sup>+</sup>* szekvenciában egy eukarióta  $\beta$ -1,3 glukanáz szuperfamiliaába tartozó (**18. ábrán** Glyco\_hydro\_81 superfamily) és három szénhidrátkötő domént kódoló szekvencia (**18. ábrán** Carb\_bi késsel jelölve) található nagyjából ugyanazokon a helyeken.



**18. ábra**

A domének elhelyezkedése a *Sch. pombe* és *Sch. japonicus* sejtseparációs fehérjékben. Részletesen a szövegben mutatjuk be [NCBI Conserved Domain adatbázis szerint].

Az *agn1*<sup>+</sup> génszekvenciákban található egy  $\alpha$ -1,3 glukanáz szupercsaládba tartozó domént kódoló rész (**18. ábrán** Glyco\_hydro\_71 superfamily). A *mid2*<sup>+</sup> génszekvenciákban megtalálható egy ún. pleckstrin homológ domén (**18. ábrán** PH-val jelölve) és egy anillin típusú fehérjékre jellemző domén (**18. ábrán** DUF1709 megjelölés) nagyjából ugyanazokon a helyeken. Az egyes domének funkcióját már az irodalmi bevezetésben részletesen ismertettük.

#### 4.1.3. A *Sch. japonicus* sejtszeparációs génjeinek szekvenciaelemzése

Miután a *Sch. pombe* fehérjék aminosavsorrendje segítségével sikerült megtalálnunk a *Sch. japonicus*-ban feltehetőleg szintén sejtszeparációs feladatokat ellátó fehérjéket, elvégeztük az őket kódoló gének szekvenciaelemzését is.

```

aaagtaagttttccttttggttctataacgattgtctggtttactactctctatctgctgctggtttttgcttc 72
ctgtgtcatcagcagttaatccccgttttctttgctttaccgctttttattggtttactgatggtttaagcgc 144
ctcgtaaacactgttgccatagcgttttgcggggaagcgtttttgttggtaaacaccaacgtcactactacc 216
cgtggtttgacccccagagccaattaacttttgacattcggcgttacccgagaagtaaacagtgactgcttctt 288
tcgcatgtaattctgggattggtttacggtgtgctatcttccaggcaacaccgcaggaatataacaaaacag 360
aacgcctgctcttaatttaaacatttctactgcagacaatctcttccatgcagttgtctctctgcaacaatt 432
gcctaacgctataaaaagaagctgctgaaggtgcgcgcttatcttactgcttgttttctta  M S 2 501
ATG TCT
F S P D T V N S L M L H E D Y K L A 20
TTT TCG CCC GAC ACC GTA AAC TCG TTA ATG TTA CAC GAG GAC TAC AAG CTC GCT 555
G R E L S P Y N Q Q E D Y L Q P A T 38
GGC CGT GAA CTA TCT CCA TAC AAC CAA CAA GAG GAC TAC TTG CAA CCT GCG ACC 609
E T P L K I E T A T S R M S S L D N 56
GAA ACG CCG CTG AAA ATT GAG ACG GCA ACG TCC AGA ATG TCT TCT CTC GAC AAT 663
L P A I P E F G T V N S D D L L K G 74
CTT CCT GCT ATT CCT GAG TTT GGT ACA GTT AAC TCA GAC GAT TTA TTA AAA GGC 717
P F D F P F V P G P A T D P A F A F 92
CCC TTT GAT TTC CCT TTC GTT CCA GGC CCT GCT ACT GAT CCT GCA TTT GCA TTC 771
S E T G L E D P Y S L V F S S S C P 110
TCT GAG ACT GGG CTC GAG GAT CCA TAC TCT CTT GTT TTT TCC TCG TCT TGT CCC 825
S L T P P S S P L M S Q L P S D P L 128
TCA TTA ACA CCC CCA TCT TCC CCC CTC ATG TCT CAG CTT CCC AGT GAC CCC TTG 879
... ..

```

#### 19. ábra

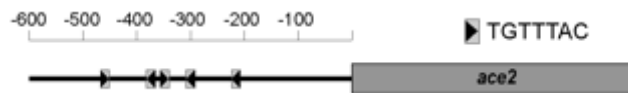
A *Sch. japonicus* *ace2*<sup>Sj</sup> gén eleje és promóter régiója. Pirossal jelöltük a 4 lehetséges kezdő metionin aminosavat, kékkel láthatóak a feltételezett Sep1p transzkripció kötéshelyek.

A szekvencia elemzések során megvizsgáltuk a gének illetve promóter régiók szerkezetét. A génszerkezet vizsgálata során az *ace2*<sup>Sj</sup> gén esetében négy feltételes start kodont találtunk a gén elején (**19. ábra**). Mi a lehetséges leghosszabb DNS szekvenciát

használtuk a kísérleteink során. A gének promóter szekvenciáinak elemzése a következő fejezetekben található.

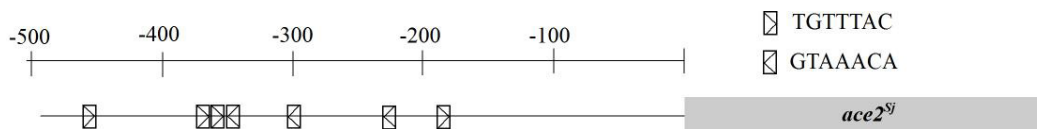
#### 4.1.3.1. Feltehetően Sep1<sup>Sj</sup> transzkripció kötőhelyek a *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génjében

Alonso-Nuñez és munkatársai (2005) leírták a Sep1p transzkripció kötőhelyeket (TGTTTAC) az *ace2<sup>+</sup>* gén promóter régiójában (**20. ábra**).



**20. ábra**

A *Sch. pombe* Sep1p transzkripció faktor kötőhelyeinek elhelyezkedése az *ace2<sup>+</sup>* gén promóterében [Alonso-Nuñez és mtsai, 2005].



**21. ábra**

Az *Sch. japonicus* Sep1p<sup>Sj</sup> transzkripció faktor lehetséges kötőhelyeinek elhelyezkedése az *ace2<sup>Sj</sup>* gén promóterében.

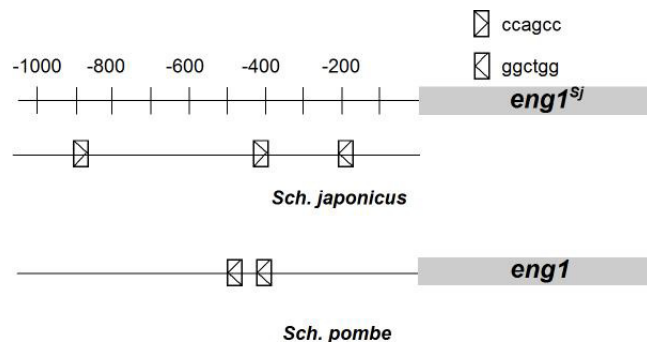
A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génjének promóter régiójában TGTTTAC és inverz komplementer GTAAACA szekvenciákat kerestünk, és ábrázoltuk a **21. ábrán**. Látható, hogy a *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* promótere hét darab feltételes Sep1p konszenzus kötőhelyet tartalmaz, míg a *Sch. pombe*-é csak ötöt. Elhelyezkedésüket tekintve mindkettőben van kötőhely -500 és -400 között egy darab, -300 körül egy darab, -300 és -400 között a *Sch. pombe*-ben kettő, míg a *Sch. japonicus*-ban három darab, -300 és -200 között is mindkettőben van egy, míg a *Sch. japonicus*-ban -200 és -100 között található egy, amely a rokonfajban nincs meg. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a *Sch. japonicus*-ban az *ace2<sup>Sj</sup>* gén a Sep1p<sup>Sj</sup> transzkripció faktor szabályozása alatt áll, hasonlóan a *Sch. pombe*-hez.

#### 4.1.3.2. Feltehetően az Ace2p<sup>Sj</sup> szabályozása alatt álló gének promóter régiójának vizsgálata a *Sch. japonicus*-ban

A *Sch. pombe* Ace2p transzkripciós faktor befolyása alatt álló gének promóterében konszenzus szekvenciájú kötőhelyek találhatóak (ccagcc) [Alonso-Nuñez és mtsai, 2005]. Megvizsgáltuk, hogy a *Sch. japonicus* *eng1<sup>Sj</sup>*, *agn1<sup>Sj</sup>* *mid2<sup>Sj</sup>* génjének promóterében megtalálhatóak-e ezek a konzervált génszakaszok.

##### 4.1.3.2.1. A *Sch. japonicus* *eng1<sup>Sj</sup>* promóterben található Ace2p<sup>Sj</sup> transzkripciós kötőhelyek

A kötőhelyek elhelyezkedését a **22. ábrán** foglaltuk össze. Látható, hogy a *Sch. pombe* és a *Sch. japonicus* *eng1<sup>+</sup>* génjének promóterében egy Ace2p kötőhely ugyanazon a helyen található -400 bp környékén, csak eltérő irányúak, a többi viszont nem mutat elhelyezkedésükben egyezést. A *Sch. japonicus* *eng1<sup>Sj</sup>* promótere három ilyen kötőhelyet, míg a *Sch. pombe*-é csak kettőt tartalmaz, és mindkettő fordított orientációjú. Az Ace2p transzkripciós kötőhelyek az *eng1<sup>+</sup>* gén promóterében a két rokonfajban különböznek, nem mutatnak nagy konzervatizmust.

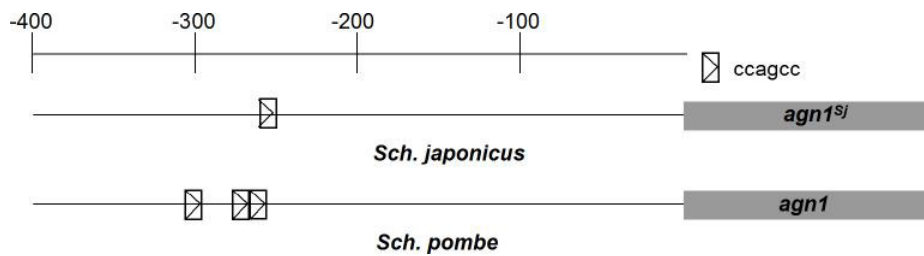


**22. ábra**

Az Ace2p transzkripciós kötőhelyek elhelyezkedése a *Sch. japonicus* és *Sch. pombe* *eng1<sup>+</sup>* gén promóterében.

#### 4.1.3.2.2. A *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* promóterben található Ace2p<sup>Sj</sup> transzkripciósi kötőhelyek

A 23. ábrán látható, hogy a *Sch. pombe agn1<sup>+</sup>* génjének promóterében három, míg a *Sch. japonicus*-éban egy Ace2p kötőhely található. A *Sch. japonicus* egy kötőhelye közel azonos pozícióban található a *Sch. pombe* egyikével. Mindkét fajban csak egyféle irányú kötőhely található. Az Ace2p transzkripciósi kötőhelyek az *agn1<sup>+</sup>* gén promóterében a két rokonfajban különböznek, nem mutatnak nagy konzervativizmust.

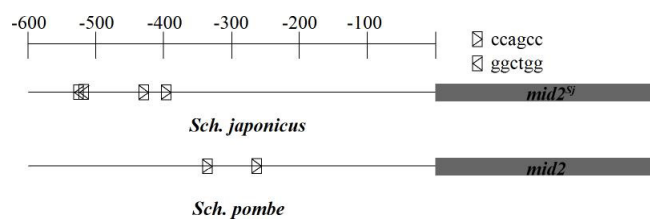


23. ábra

Az Ace2p transzkripciósi kötőhelyek elhelyezkedése a *Sch. japonicus* és *Sch. pombe agn1<sup>+</sup>* gén promóterében.

#### 4.1.3.2.3. A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>* promóterben található Ace2p<sup>Sj</sup> transzkripciósi kötőhelyek

A 24. ábrán látható, hogy a *Sch. pombe mid2<sup>+</sup>* génjének promóterében kettő, míg a *Sch. japonicus*-éban négy darab Ace2p kötőhely található. A *Sch. japonicus* két feltételezhető kötőhelye átfed egymással (szekvenciája: ggctggct). A kötőhelyek elhelyezkedése a két fajban nem mutat hasonlóságot.



24. ábra

Az Ace2p transzkripciósi kötőhelyek elhelyezkedése a *Sch. japonicus* és *Sch. pombe mid2<sup>+</sup>* gén promóterében.

## 4.2. A *Sch. pombe* sejtseparációs gének ortológjainak inaktiválása a *Sch. japonicus*-ban

### 4.2.1. A *Sch. japonicus sepI<sup>Sj</sup>* és *engI<sup>Sj</sup>* gének inaktiválásának közös lépései

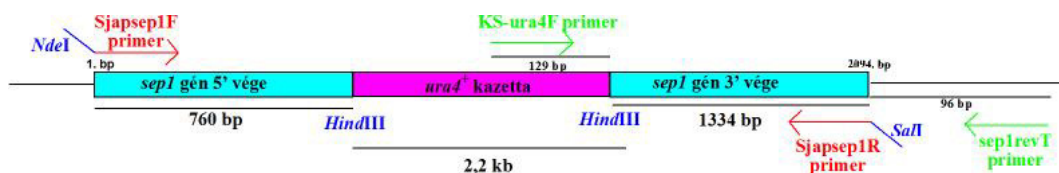
A vad típusú *Sch. japonicus* (7-1) törzsből gDNS-t izoláltunk a 3.5.1 fejezet szerint. Adott primereket (a konkrét primereket lásd a gének saját fejezetében) használva PCR-rel felszaporítottuk (3.5.2. fejezet) a *Sch. japonicus sepI<sup>Sj</sup>* és *engI<sup>Sj</sup>* gént. A rekcióhoz Pfu (Fermentas) polimerázt használtunk. A PCR hőmérsékleti kondíciói a következők voltak: 1. lépés: 94 °C, 3 perc; 2. lépés: 94 °C, 30 másodperc; 3. lépés: 55 °C, 20 másodperc; 4. lépés: 72 °C, 4 perc; 5. lépés: 2-4 lépés 30-szor ismételve; 6. lépés 72 °C, 10 perc; 7. lépés 4 °C, ∞. A keletkezett PCR termék méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (3.5.3. fejezet). A PCR primerekbe adott restriktív enzim hasítóhelyeket (a konkrét hasítóhelyeket lásd a gének saját fejezetében) terveztünk a későbbi klónozási lépésekhez. A két gént köztes lépéssel vagy anélkül a pUC18 vektorba klónoztuk. A klónozások során elértük a pUC18 vektorban található *HindIII* felismerőhely eltávolítását, ami a vektorban a *NdeI* és *SalI* helyek között található (14. ábra). A *HindIII* hasítóhely eltávolítására azért volt szükségünk, mert a megléte zavarta volna a beépített gének megszakítását, amihez a *sepI<sup>Sj</sup>*-ben és *engI<sup>Sj</sup>*-ben található *HindIII* hely(ke)t vettük igénybe. Ennél a helynél felnyitottuk a pUC18-*sepI<sup>Sj</sup>* és pUC18-*engI<sup>Sj</sup>* vektort, hogy beépíthessük a felnyitás helyére a *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* génjét. Az utóbbit a KS-*ura4* vektorból (15. ábra) vágtuk ki *HindIII* hasítással. Az *ura4<sup>+</sup>* beépítésével megszakítottuk a *Sch. japonicus sepI<sup>Sj</sup>* és *engI<sup>Sj</sup>* génjét. Az így kapott *sepI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* *engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* génkiütéses kazettát adott restriktív enzimekkel (a konkrét restriktív helyeket lásd a gének saját fejezetében) kivágtuk a plazmidból, és lineáris fragmentumként használtuk a *Sch. japonicus ura4<sup>-</sup>* (7-252) törzs transzformálásához. A megfelelő koncentrációjú DNS eléréséhez vákuumcentrifugát használtunk (3.9.1. fejezet). A transzformálás elektroporátoros módszerrel történt a 3.5.6. fejezet leírása alapján. Transzformálás után a sejteket EMMA táptalajra szélesztettük, és a csészéket 30 °C fokon inkubáltuk 5-7 napig. Ezen a táptalajon csak az olyan sejtek hoznak létre telepeket, amelyek genomjába beépült a génkiütéses kazetta mert a megszakításhoz használt *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* gén képes komplementálni az *Sch. japonicus ura4<sup>Sj</sup>* mutációját [Furuya és Niki, 2009].

A kapott prototróf telepekből (transzformánsokból) gDNS-t izoláltunk, és PCR-rel ellenőriztük a *sepI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* és *engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* génkiütéses kazetta genomba épülését. A PCR -hez a DreamTaq DNA polimerase (Fermentas) enzimet használtuk. A hőmérsékleti kondíciók a következők voltak: 1. lépés: 95 °C, 3 perc ; 2. lépés: 95 °C, 30 másodperc 3.

lépés: 55 °C, 30 másodperc; 4.lépés: 72 °C, 4 perc; 5. lépés 2-4 lépés 30-szor ismételve; 6. lépés: 72 °C, 10 perc; 7.lépés 4 °C, ∞. Az ellenőrzéshez adott primereket használtuk (a konkrét primereket lásd a gének saját fejezetében). A várható PCR termék hosszát kiszámoltuk és összehasonlítottuk a kapott PCR termék méretével a génkiütés sikerességének megállapításához.

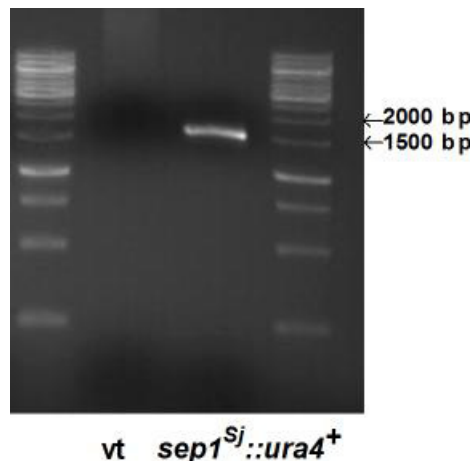
#### 4.2.1.1. A *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>* génjének megszakítása

A Sjapsep1F és Sjapsep1R (3. táblázat) PCR primereket használva történt (25. ábrán pirossal jelölve) a *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>* gén felszaporítása. A keletkezett PCR terméket tompa véggel ligáltuk a pJET1.2. vektorba a Clone Jet Kit (Fermentas) utasításai szerint. A PCR primerekbe *NdeI* és *SalI* restrikciós enzim hasítóhelyeket terveztünk (3. táblázatban pirossal jelölve), így ezzel a két enzimmel emésztve a pJET1.2-*sep1<sup>Sj</sup>* vektort olyan ragadós végekkel rendelkező fragmentumot kaptunk, amely tartalmazta a gént és beépíthető volt a hasonló módon felnyitott pUC18 vektorba. Ennek a két enzimnek a használatával elértünk egy másik célt is, a pUC18 vektorban található *HindIII* felismerőhely eltávolítását, ami ugyanis a vektorban a *NdeI* és *SalI* helyek között található (14. ábra). A *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>* gén a 760. bp-nál tartalmaz egy *HindIII* restrikciós enzim felismerőhelyet (25. ábra). Ennél a helynél felnyitottuk a pUC18-*sep1<sup>Sj</sup>* vektort, hogy beépíthessük a felnyitás helyére a *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* génjét. Az utóbbit a KS-*ura4* vektorból (15. ábra) vágtuk ki *HindIII* hasítással. Az *ura4<sup>+</sup>* beépítésével megszakítottuk a *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>* génjét. Az így kapott *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* génkiütéses kazettát (25. ábra) az *NdeI* és *SalI* restrikciós enzimekkel kivágtuk a plazmidból, és lineáris fragmentumként használtuk a *Sch. japonicus ura4<sup>-</sup>* (7-252) törzs transzformálásához.



25. ábra

A *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* génkiütéses kazetta feltételezett szerkezete a genomba integrálódva. Pirossal jelöltük a gén amplifikálásához szükséges, zölddel a kazetta megfelelő helyre történő beépülésének ellenőrzésére alkalmas primereket (az ábra nem méretarányos).



**26. ábra**

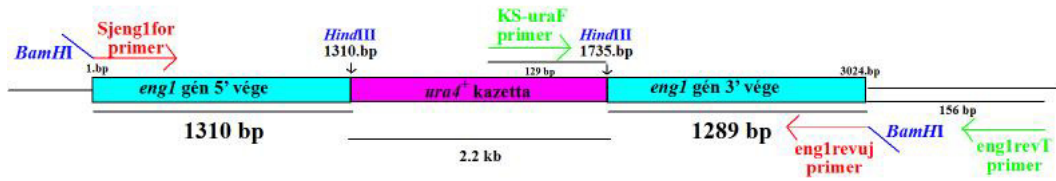
A *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>* megszakításának ellenőrzése. A vad típusú (7-1) és *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-254) törzsekből izolált gDNS-sel végzett PCR termékeinek agaróz gélelektroforézise.

A kapott prototróf telepekből (transzformánsokból) gDNS-t izoláltunk, és PCR-rel ellenőriztük a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* génkiütéses kazetta beépülését (**26. ábra**). Az **25. ábrán** látható, hogy a KS-ura4F a *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazettával, míg a *sep1revT* primer a *sep1<sup>Sj</sup>* gén utáni régióval komplementer. A várható PCR termék mérete a **25. ábra** alapján kiszámítható:  $129+1334+95=1558$  bp. A **26. ábrán** látható, hogy a vad típusnál (7-1) nem képződik PCR-termék, míg a *Sch. japonicus* transzformánsnál (7-254) létrejön a várható méretű sáv. Tehát a génkiütéses kazetta a megfelelő helyre ékelődött be, vagyis a *sep1<sup>Sj</sup>* gént sikeresen megszakítottuk a *Sch. japonicus* genomjában.

#### 4.2.1.2. A *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>* génjének megszakítása részleges delécióval

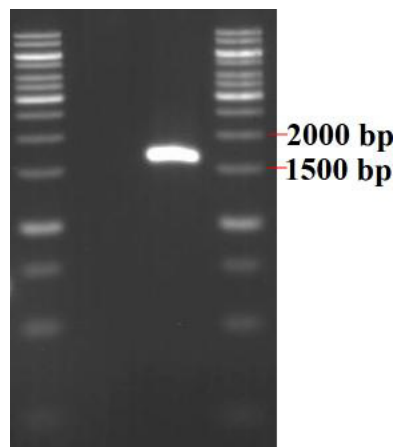
A *Sjeng1for* és *eng1revujBA* (**3. táblázat**, **32. ábrán** piros színnel jelölve) primereket használtuk a *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>* génjének felsokszorozásához. A primerekbe *BamHI* restrikciós enzim felismerőhelyet terveztünk, a restrikciós felismerőhelyeket a primerekben pirossal jelöltük (**3. táblázat**). A PCR termék ligálása pUC18 vektor *BamHI* helyére történt. A pUC18 vektor a ligálás előtt módosításra került. *NdeI-SalI* emésztéssel kivágtuk (3.5.4. fejezet) belőle a *HindIII* helyet (**14. ábra**), amely zavarta volna a további klónozási lépéseket, ugyanis a génbe *HindIII* hellyel ligáltuk a *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazettát. A vektort a pJET1.2 Cloning kitből (Fermentas) származó blunting enzyme-mel kezeltük, majd a kit előírása szerint ligáltuk saját magával. Az így kapott vektor nem tartalmazta a *HindIII*

hasítóhelyet, ebbe klónoztuk *Bam*HI-gyel az *Sch. japonicus engI<sup>Sj</sup>* génjét a 3.5.5. fejezet leírása alapján.



**32. ábra**

Az *engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* génkiütéses kazetta genomba épült feltételezett szerkezete. Pirossal jelölve láthatóak a felsokszorozáshoz szükséges, zölddel a helyes integrációt ellenőrző primerek (az ábra nem méretarányos).



*vt engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>*

**33. ábra**

Az *engI<sup>Sj</sup>* megszakítás ellenőrzése. Vad típusú (7-1) és *engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) *Sch. japonicus* törzsek gDNS-ével végzett PCR termékeinek agaróz gélelektroforézise.

A *Sch. japonicus engI<sup>Sj</sup>* gén az 1310. és 1735. bp-nál tartalmaz *Hind*III restrikciós enzim felismerőhelyet (**32. ábra**). A továbbiakban a *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazettát a *Hind*III enzimmel kivágtuk a KS-ura4 vektorból (3.5.4. fejezet), és ligáltuk a pUC18-*engI<sup>Sj</sup>* vektor *Hind*III helyére (3.5.5. fejezet), ami így megszakítja az intakt *engI<sup>Sj</sup>* gént. Az így kapott *engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* génmegszakításos kazettát az *Bam*HI restrikciós enzimmel vágtuk ki a pUC18 vektorból (3.5.4. fejezet), és használtuk lineáris fragmentumként az *Sch. japonicus ura4<sup>-</sup>* (7-

252) törzs transzformálásához. A genomba beépült génkiütéses kazetta feltételezhető szerkezete a **32. ábrán** látható.

PCR-rel ellenőriztük az  $engI^{Sj}::ura4^+$  génmegszakításos kazetta beépülését (3.5.2. fejezet). A PCR-hez a következő primereket használtuk: KSura4F primer  $engIrevT$  primer (**3. táblázat, 32. ábrán zölddel jelölve**). A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá (**33. ábra**). Az  $engI^{Sj}::ura4^+$  (7–255) mutánsból keletkezett PCR termék mérete 1500 és 2000 bp között volt, ami megfelel a várható méretnek, ugyanis a **32. ábrán** látható, hogy a KSura4F és  $engIrevT$  primerrel 129 bp+1289 bp +156 bp = 1574 bp hosszúságú PCR termék keletkezhet. A vad típusú törzs (7-1) esetében nem keletkezett DNS sáv a használt primerekkel. Tehát az  $engI^{Sj}$  gén megszakításos deléciója sikeres volt.

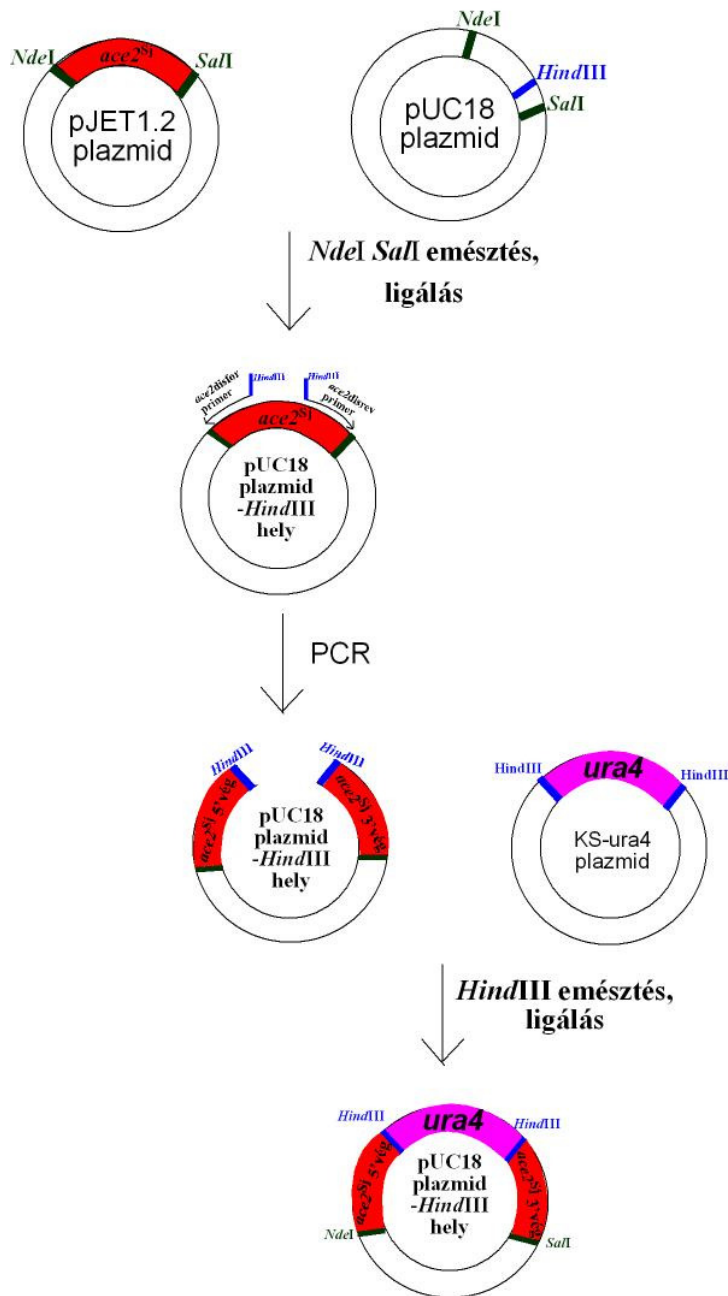
#### 4.2.2. A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génjének megszakítása részleges delécióval

A *Sch. pombe ace2<sup>+</sup>*-höz hasonló *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* gén szekvenciájában a gén elején négy feltételes ATG startkodon található (4.1.3. fejezet). A leghosszabb lehetséges DNS szekvenciához terveztük a felsokszorozáshoz szükséges primereket. A PCR-hez először genomi DNS-t izoláltunk a *Sch. japonicus* vad típusú (7-1) törzsből üveggyöngyös módszerrel a 3.5.1. fejezet leírása szerint. A Sjace2F Sjace2R primereket (**28. ábrán** pirossal jelölve, 3.3. fejezet) használtuk az  $ace2^{Sj}$  gén felsokszorozásához. A primerekbe terveztünk egy *NdeI* (forward primer) és egy *SalI* (reverse primer) restriktions enzim felismerőhelyet a klónozáshoz (**3. táblázatban** pirossal jelölve). A PCR-t Pfu polimerázzal végeztük (Fermentas) a 3.5.2. fejezet leírása szerint. A hőmérsékleti kondíciók a következők voltak: 1. lépés: 94 °C, 3 perc; 2. lépés: 94 °C, 30 másodperc; 3. lépés: 55 °C, 20 másodperc; 4. lépés: 72 °C, 4 perc; 5. lépés: 2-4 lépés 30-szor ismételve; 6. lépés: 72 °C, 10 perc; 7. lépés: 4 °C, ∞. A PCR termék ligálása pJET 1.2-be (Fermentas) a kit előírása szerint (Clone JET PCR Cloning Kit) tompa véggel történt (3.5.5. fejezet).

Az  $ace2^{Sj}$  géndelécióhoz szükséges további lépések a **27. ábrán** láthatóak. Az  $ace2^{Sj}$  gént az *NdeI SalI* enzimmel kivágtuk (3.5.4. fejezet) a pJET1.2- $ace2^{Sj}$  vektorból és ligáltuk ugyanezzel a két restriktions enzimmel a pUC18 vektorba (3.5.5. fejezet). Ezzel a lépéssel kivágódik a pUC18 vektorból a *HindIII* hely (**14. ábra**), amely zavarná a további lépéseket, ugyanis a *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazettáját a *HindIII* enzimmel terveztük integrálni az  $ace2^{Sj}$  génbe. Az  $ace2disfor ace2disrev$  primereket terveztük a pUC18- $ace2^{Sj}$  vektorhoz. Pirossal jelöltük a *HindIII* restriktions enzim felismerő helyet a primerekben a 3.3. fejezetben. A PCR-t Pfu polimerázzal végeztük (Fermentas). A hőmérsékleti kondíciók megegyeznek az

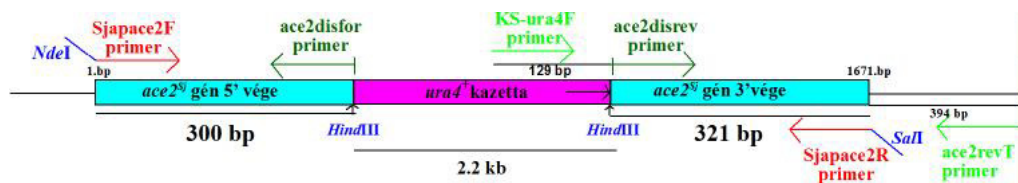
ebben a fejezetben ismertetett első reakcióéval. A keletkezett PCR termék kb. 300-300 bp-t tartalmaz az *ace2<sup>Sj</sup>* gén elejéből és végéből a pUC18 vektorban *HindIII* restrikciós enzimelemelőhelyével a gén két végén. A KS-ura4 vektorból (**15. ábra**) kivágtuk a *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazettát *HindIII* restrikciós enzimmel, és ligáltuk (3.5.5. fejezet) a pUC18-*ace2<sup>Sj</sup>* plazmid *HindIII* helyére. Az így keletkezett plazmidból *NdeI* *SalI* enzimekkel szabadítottuk fel az *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* lineáris fragmentumot (**28. ábra**). A megfelelő töménységű DNS eléréséhez vákuumcentrifugát használtunk (3.9.1. fejezet). A *Sch. japonicus ura4<sup>-</sup>* (7-252) törzset transzformáltuk az *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* lineáris fragmentummal elektroporátoros módszerrel (3.5.6. fejezet). A transzformánsokat EMMA minimál táptalajra szélesztettük, 30 °C -on inkubáltuk 5-7 napig. A kapott prototróf telepeket ellenőriztük, hogy sikeres volt-e a génkiütés.

A genomba beékelődött *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* deléció kazetta a különböző célokra használt primerekkel a **28. ábrán** látható. A géndeléción ellenőrzéséhez először genomális DNS-t izoláltunk üvegyöngyös módszerrel a *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-258) törzsből a 3.5.1. fejezet alapján, majd PCR-t végeztünk, amihez a KS-ura4F primert, amely az *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazettához hibridizál, és az ace2revT primert, amely pedig az *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* gént követő szakasszal komplementer, használtuk. Egy másik PCR-t végeztünk az *ace2<sup>Sj</sup>* gén felszaporításához szükséges primerekkel (ace2for és ace2rev) is, amellyel bizonyítani lehet a génkiütéses kazetta beépülését a genomba, de nem elegendő a helyspecifikus beékelődés kimutatásához. A PCR-t a 3.5.2. fejezet leírása alapján DreamTaq DNA polimerase (Fermentas) enzimmel végeztük. A hőmérsékleti kondíciók a következők voltak: 1. lépés: 95 °C, 3 perc; 2. lépés: 95 °C, 30 másodperc; 3. lépés: 55 °C, 30 másodperc; 4. lépés: 72 °C, 4 perc; 5. lépés: 2-4 lépés 30-szor ismételve; 6. lépés 72 °C, 10 perc; 7. lépés 4 °C, ∞. A PCR termékeket gélelektroforézissal tettük láthatóvá a 3.5.3.-as fejezet alapján. Azt tapasztaltuk, hogy a KS-ura4F és ace2revT primerekkel nem keletkezett PCR termék (**30. ábra**, 3. reakció) se a vad típus, se pedig a mutáns törzs esetében. A KS-ura4F és ace2rev primerekkel sem keletkezett termék (**30. ábra**, 2. reakció). A KS-ura4 és ace2for primerekkel viszont az *ace2<sup>Sj</sup>* mutánsban keletkezett egy kb. 500 bp nagyságú termék (**30. ábra**, 1. reakció).



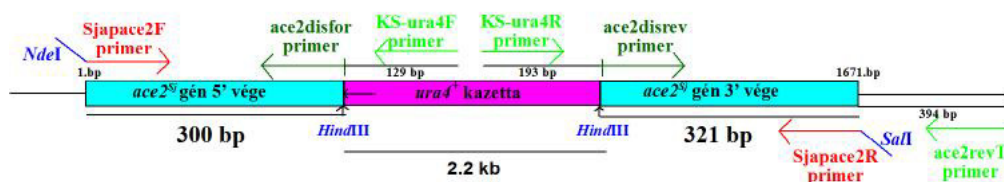
27. ábra

A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* gén deléciójához szükséges vektor-konstrukció elkészítésének folyamata (az ábra nem méretarányos).



28. ábra

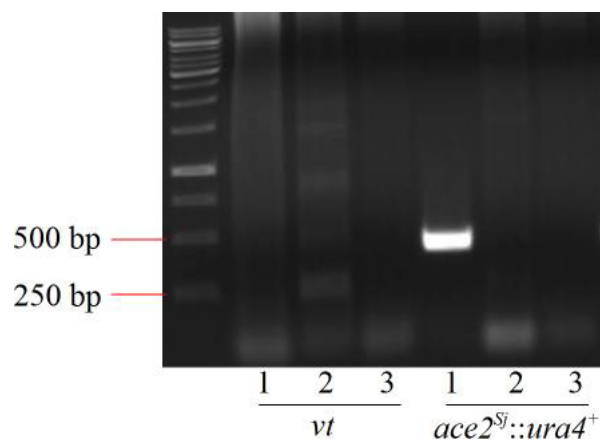
Az  $ace2^{Sj}::ura4^+$  génkiütéses kazetta feltételezett genomba ékelődött szerkezete. A *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazetta iránya megegyezik az *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* gén irányával. Az ábrán pirossal jelölve láthatóak a felszorzóításhoz szükséges primerek. Világoszölddel jelöltük a kazetta helyes beékelődésének ellenőrzéséhez szükséges primereket, sötétzölddel pedig a génkiütéshez használt primereket (az ábra nem méretarányos).



29. ábra

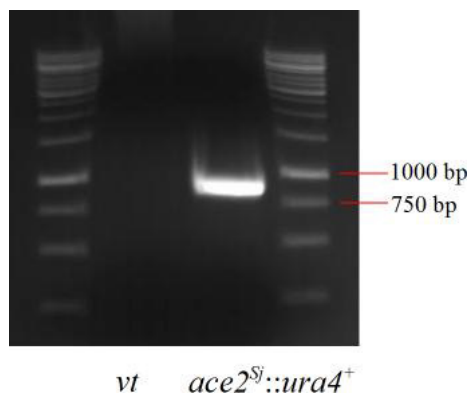
Az  $ace2^{Sj}::ura4^+$  génkiütéses kazetta feltételezett genomba ékelődött szerkezete. Az *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazetta iránya fordított helyzetű a *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* gén irányához képest. Az ábrán pirossal jelölve láthatóak a felszorzóításhoz szükséges primerek. Világoszölddel jelöltük a kazetta helyes beékelődésének ellenőrzéséhez szükséges primereket, sötétzölddel pedig a génkiütéshez használt primereket (az ábra nem méretarányos).

Ez azt bizonyítja, hogy az *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazetta valószínűleg fordítva integrálódott be a *HindIII* helyeknél a deléciós plazmidba. A **28. ábrán** látható, hogy a KS-ura4F és ace2for primerekkel egy 129 bp+300 bp= 429 bp méretű PCR terméket várhatunk, ami megegyezik az általunk kapott termék méretével. Az ismert PCR bizonyítja, hogy a kazetta beintegrálódott a genomba, de azt nem, hogy az  $ace2^{Sj}$  gén helyére. Megismételtük a reakciót a KS-ura4R primerrel, amely szintén a *Sch. pombe ura4<sup>+</sup>* kazettával komplementer, csak fordított irányú az elsőként használt KS-ura4F primerhez képest. Másik primerként az ace2revT primert használtuk (**29. ábra**).



**30. ábra**

A *Sch. japonicus*  $ace2^{Sj}$  deléció ellenőrzése PCR-rel. A vad típusú (7-1) és  $ace2^{Sj}::ura4^+$  (7-258) *Sch. japonicus* törzsek gDNS-ével végzett PCR termékének futtatása agaróz gélelektroforézissel. A (1) KS-ura4F és ace2for ; (2) KS-ura4F és ace2revT; (3) KS-ura4F és ace2revT primerekkel végzett reakciók termékei.



**31. ábra**

A *Sch. japonicus*  $ace2^{Sj}$  génmegszakításának ellenőrzése PCR-rel. Vad típusú (7-1) és  $ace2^{Sj}::ura4^+$  (7-258) *Sch. japonicus* törzsek gDNS-ével végzett PCR termékek gélelektroforézise KS-ura4R és ace2revT primerek felhasználásával.

Azt feltételeztük ugyanis, az előzőek alapján hogy a *Sch. pombe*  $ura4^+$  kazetta a *Sch. japonicus*  $ace2^{Sj}$  génnel ellentétes orientációban ékelődött be a génbe, ugyanis két *HindIII* hellyel történt a ligálás, amely megengedi mind a két orientációt (27. ábra). Feltételezésünk helyesnek bizonyult, ugyanis a KS-ura4R és ace2revT primerekkel keletkezett PCR termék (31. ábra). A 29. ábrán látható, hogy a PCR termék várható mérete  $193 \text{ bp} + 321 \text{ bp} + 394 \text{ bp} = 908 \text{ bp}$ . Az általunk kapott PCR termék pedig a DNS létra szerint

a 750 és 1000 bp-ok között található a mutánsban, míg a vad típusú törzsből nem sokszorozódott fel ekkora méretű DNS szakasz (31. ábra).

Mindezek alapján megállapítható, hogy a *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génjének megszakítása sikeres volt, a géniütéses kazetta a megfelelő homológ helyre ékelődött be.

#### 4.2.3. A *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* és *mid2<sup>Sj</sup>* gének inaktiválásának közös lépései

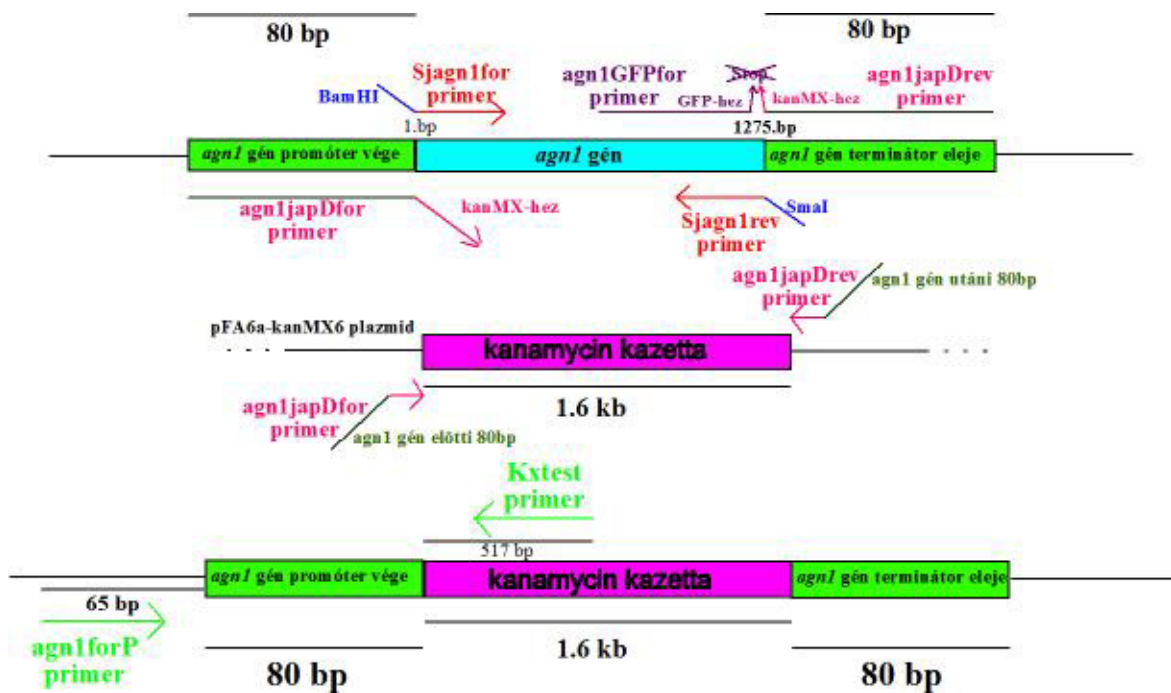
A deléciónhoz a pF6kanMX6 (15. ábra) vektorhoz terveztünk specifikus (a konkrét primereket lásd a gének saját fejezetében) primereket. A primerek eleje 80-80 bp-t tartalmaz az *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup> mid2<sup>Sj</sup>* gént megelőző és követő szekvenciákból, a primerek vége pedig a pF6kanMX6 vektorhoz komplementer [Bähler és mtsai 1998]. A PCR-t a 3.5.2. fejezetben leírtak alapján végeztük High Fidelity Enzyme-mel (Finnzyme) és a pFA6a-kanMX6 plazmidot használva templátként. A hőmérsékleti kondíciók a következők voltak: 1. lépés: 98 °C, 3 perc; 2. lépés: 98 °C, 10 másodperc; 3. lépés: 55 °C, 20 másodperc; 4. lépés: 72 °C, 1,5 perc; 5. lépés: 2-4 lépés 30-szor ismételve; 6. lépés: 72 °C, 10 perc; 7. lépés: 4 °C, ∞. A kapott PCR terméket kitisztítottuk GFX oszlopon (GE Healthcare), majd töményítettük vákuumcentrifugálással (3.9.1. fejezet) a megfelelő DNS koncentráció eléréséhez. A transzformációhoz a *Sch. japonicus ura4<sup>-</sup>* (7-252) törzset használtuk. A transzformálás elektroporátoros módszerrel a 3.5.6. fejezet leírása szerint történt. A transzformánsokat YEA csészére szélesztettük, és egy nap után átreplikáztuk YEA+100 és 200 mg/ml geneticin tartalmú szilárd táptalajra majd 30 °C fokon inkubáltuk őket 5-7 napig. A kapott transzformánsokból genomiális DNS-t izoláltunk üvegyöngyös módszerrel a 3.5.1. fejezet alapján, és PCR-rel (3.5.2. fejezet) ellenőriztük az *agn1<sup>Sj</sup>::kanMX6* és *mid2<sup>Sj</sup>::kanMX6* kazetta helyes beépülését a genomba. Az ellenőrző PCR-hez adott primereket használtuk (a konkrét primereket lásd a gének saját fejezetében).

A PCR-t a 3.5.2. fejezet szerint végeztük, és a Dream Taq DNA polimeráz enzimet (Fermentas) használtuk. A hőmérsékleti kondíciók a következők voltak: 1. lépés: 95 °C, 3 perc ; 2. lépés: 95 °C, 30 másodperc 3. lépés: 55 °C, 30 másodperc; 4. lépés: 72 °C, 4 perc; 5. lépés: 2-4 lépés 30-szor ismételve; 6. lépés: 72 °C, 10 perc; 7. lépés 4 °C, ∞. A várható és kapott PCR termékek méretének összevetéséből megállapítható, hogy a géniütés sikeres volt-e.

#### 4.2.3.1. A *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* génjének deléciója

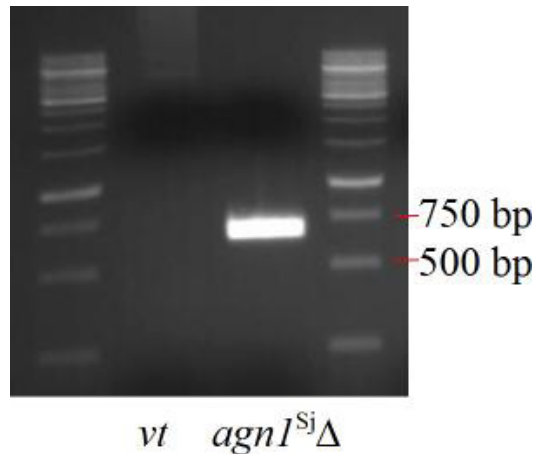
A delécióhoz a pF6kanMX6 (15. ábra) vektorhoz az agn1japDfor és agn1japDrev primereket (3. táblázat, 34. ábrán lila színnel jelölve) terveztük. A primerek eleje 80-80 bp-t tartalmaz az *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* gént megelőző és követő szekvenciákból, a primerek vége pedig a pF6kanMX6 vektorhoz komplementer (34. ábra) [Bähler és mtsai 1998].

PCR-rel (3.5.2. fejezet) ellenőriztük az *agn1<sup>Sj</sup>::kanMX6* kazetta helyes beépülését a genomba (35. ábra). Az ellenőrző PCR-hez a következő primereket használtuk: KXtest primer és agn1forP (34. ábrán világoszölddel jelölve). A KXtest primer a kanamycin génnel komplementer az agn1forP primernek megfelelő szakasz pedig az *agn1<sup>Sj</sup>* gén promóterében található (34. ábra).



34. ábra

A *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* gén deléciójának stratégiája és a genomba beékelődött génkiütéses kazetta feltételezett szerkezete. Pirossal jelöltük a gén felszaporításához használt; (komplementációhoz), sötét rózsaszínnel a géndelécióhoz, világoszölddel a deléció ellenőrzéséhez, lilával a GFP jelöléshez szükséges primereket. (az ábra nem méretarányos).



**35. ábra**

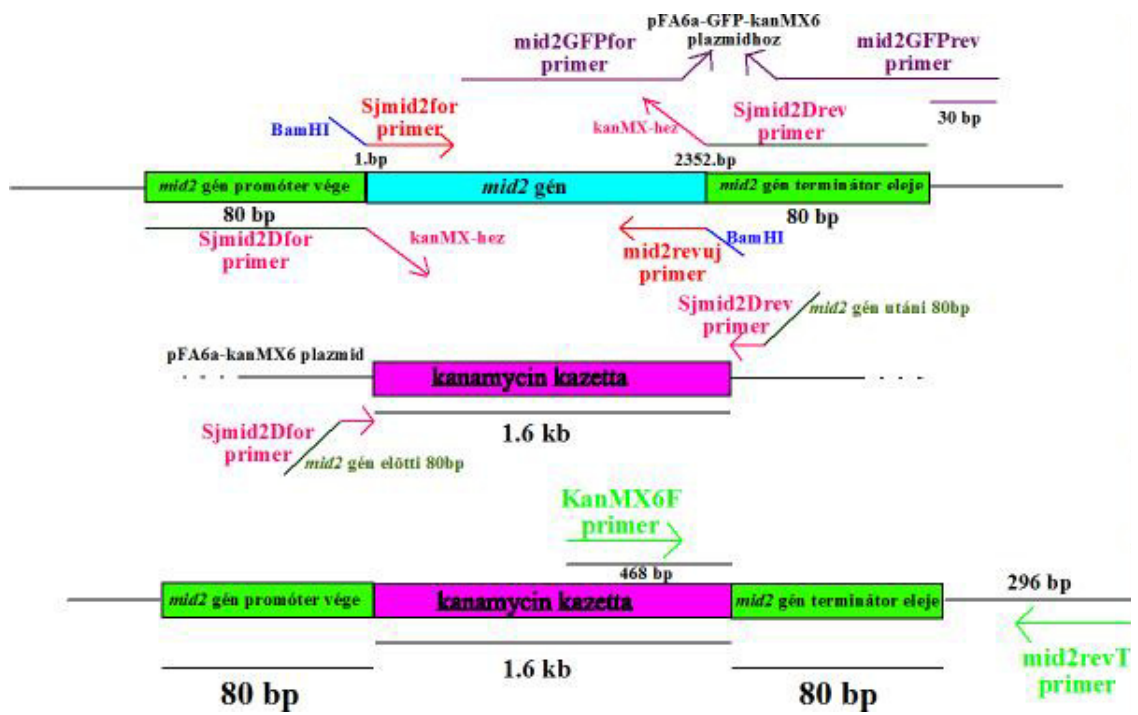
A *Sch. japonicus agnI<sup>Sj</sup>* gén kiütésének ellenőrzése PCR-rel, amit a vad típusú (7-1) és *Sch. japonicus agnI<sup>Sj</sup>Δ* (7-256) törzsekből izolált DNS-sel végeztünk.

A **34. ábra** alapján kiszámolható, hogy a Kxtest és agnIforP primerek által felszorzozható szakasz mérete: 65 bp + 80 bp + 517 bp, azaz 662 bp. Az **35. ábrán** látható, hogy az *agnI<sup>Sj</sup>Δ* (7-256) törzsből felszaporított PCR termék mérete kb. 750 bp, a vad típusból (7-1) nem keletkezik felszaporított DNS ezekkel a primerekkel, tehát a géнкиütés sikeres volt.

#### 4.2.3.2. A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>* génjének deléciója

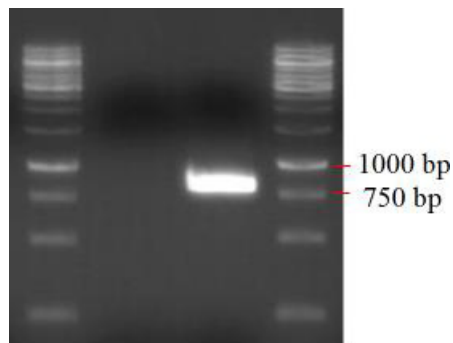
A delécióhoz a pFA6a-kanMX6 (**15. ábra**) [Bähler és mtsai,1998] vektorhoz tervezett mid2japDfor és a mid2japDrev primereket (**3. táblázat**) használtuk, amelyeket a **36. ábrán** lila színnel jelöltünk. A primerek eleje 80-80 bp-t tartalmaz az *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>* gén megelőző és követő génszekvenciából, a primerek vége pedig a pFA6a-kanMX6 vektorral komplementer (**36. ábra**).

PCR-rel ellenőriztük az *mid2<sup>Sj</sup>::kanMX6* kazetta beékelődését a genomba (**37. ábra**). A PCR-hez a következő primereket használtuk: kanMX6F és mid2revT (3.3. fejezet). A kanMX6F primer a kanamycin génnel komplementer az mid2revT primernek megfelelő szakasz pedig az *mid2<sup>Sj</sup>* gén után található (**37. ábrán** világoszölddel jelölve).



36. ábra

A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>* gén kiütésének és GFP jelölésének stratégiája. Pirossal jelöltük a felszorzozáshoz szükséges, rózsaszínnel a deléciohoz, lilával a GFP jelöléshez, világoszölddel pedig a delécio ellenőrzéséhez szükséges primereket (az ábra nem méretarányos).



*vt mid2<sup>Sj</sup>Δ*

37. ábra

A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>* delécio ellenőrzése. Vad típusú (7-1) és *mid2<sup>Sj</sup>Δ* (7-260) törzsekből izolált gDNS-sel végzett PCR termékek agaróz gélelektroforézise.

A 36. ábrán látható, hogy a két említett primerrel a PCR termék várható mérete: 468 bp + 80 bp + 296 bp = 844 bp. A 37. ábra mutatja a PCR eredményét, hogy a *mid2<sup>Sj</sup>Δ* (7-260) mutánsban 1000 bp és 750 bp között található PCR termék, melynek mérete

megfelel a várt 844 bp-nak, míg a vad típusban (7-1) nem látható DNS szakasz ezekkel a primerekkel. A *mid2<sup>Sj</sup>* gén kiütése tehát sikeres volt a *Sch. japonicus* -ban.

### 4.3. A mutánsok morfológiai vizsgálata

#### 4.3.1. A mutánsok fenotípusa az élesztő-fázisban

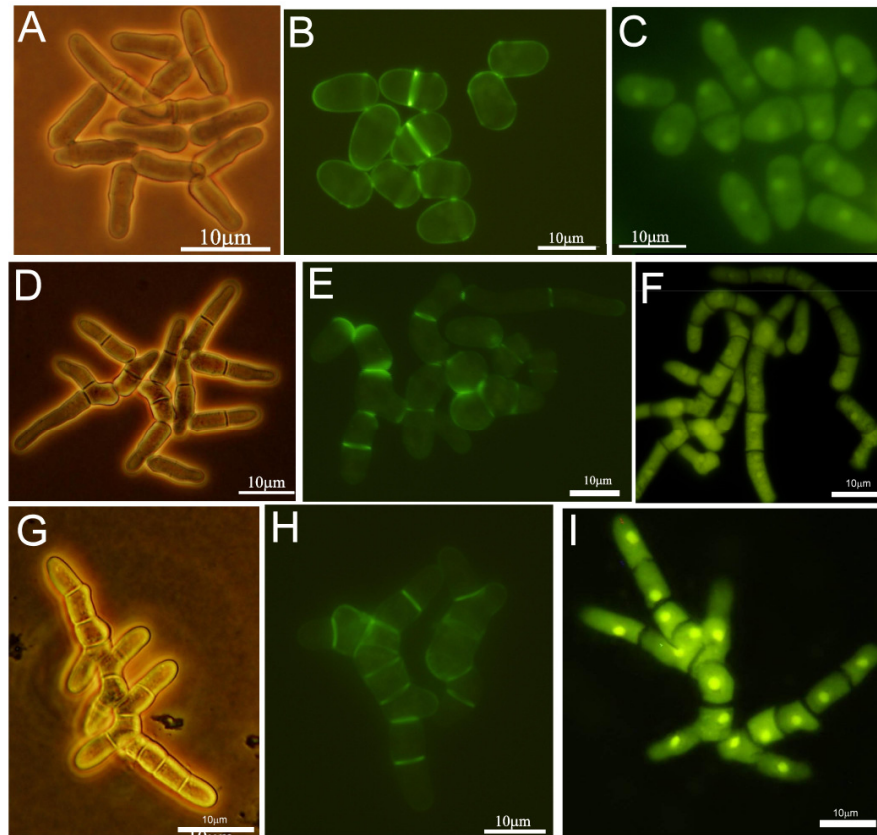
##### 4.3.1.1. Mikroszkópi morfológia

A morfológiai vizsgálatokhoz a *Sch. japonicus* 7-1 vad típusú, valamint a 7-254 *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>*, 7-258 *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>*, 7-256 *agn1Δ*, 7-255 *eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* és 7-260 *mid2Δ* mutáns törzseit használtuk. A mikroszkópos vizsgálatok szilárd MMA táptalajon 30 °C-on, egy éjszakán át tartó tenyésztés után történtek fáziskontraszt és fluoreszcens mikroszkópiával. A **38/A-C ábrán** látható, hogy a vad típusú *Sch. japonicus* tenyészetében a sejtek különállóak és hengeresek. Időnként lehet sejt párokat is látni, amelyeket a köztük levő szeptum választ el. Ezek valószínűleg testvérsejtek, amelyeknél még nem játszódtott le a sejtszeparáció. A mutánsok sejtjei (**38; 40; 41; 42. ábrák**) ezzel szemben általában láncokat alkotnak, ami arra utal, hogy náluk a sejtszeparáció gyakran elmarad. A calcofluoros festés után a szeptumok világítanak a fluoreszcens mikroszkópban, ami azt bizonyítja, hogy bennük nem oldódott fel az elsődleges szeptum. A mutánsok sejtlancai időnként elágaztak, amiből arra lehet következtetni, hogy a belső sejtek a szeptumfeloldás elmaradása ellenére is képesek nőni, de nem a végeiken, hanem oldal-irányban. A sejtek döntő része egyetlen sejtmagot tartalmazott úgy a vad tenyészetben, mint a mutánsok tenyészeiben.

##### 4.3.1.1.1. A *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* törzs morfológiai vizsgálata

A *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* törzs (7-254) mikroszkópos vizsgálatai szilárd MMA+kiegészítő táptalajon 30 °C-on, egy éjszakán át tartó tenyésztés után történtek. A sejteket calcofluor és DAPI festéssel is megvizsgáltuk. A képekből látható, hogy összehasonlítva a vad típusú (7-1) törzzsel (**38/A ábra**), amelynek hengeres sejtjei vannak, és osztódáskor egy szeptumot tartalmaznak, a *sep1<sup>Sj</sup>* mutáns *Sch. japonicus* törzs (7-254) sejtjei elágazó láncokat alkotnak (**38/D ábra**). Calcofluoros festéssel (**38/E ábra**) megfigyelhető, hogy több szeptumot, DAPI festéssel (**38/F ábra**) pedig, hogy több sejtmagot tartalmaznak ezek a láncok. Ez a fenotípus hasonló a *Sch. pombe sep1<sup>-</sup>* mutáns (2-1407) törzs fenotípusához (**39/D, E, F ábrák**). Tehát azt feltételezhetjük, hogy a Sep1p transzkripció

faktor szerepe hasonló a két rokon fajban, mindkettőben részt vesz a sejtszeparáció szabályozásában.



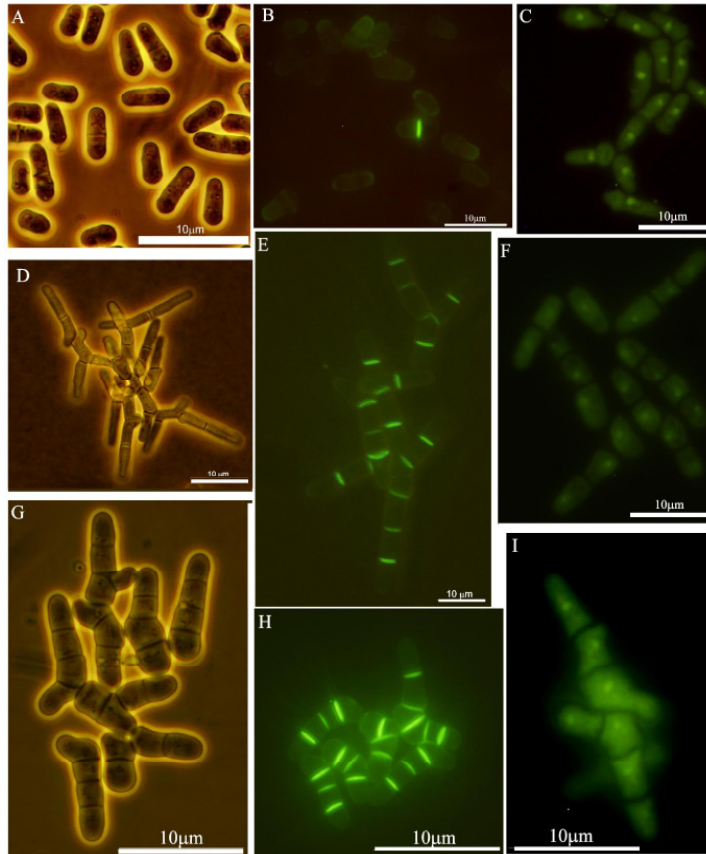
**38. ábra**

A (A-C) *Sch. japonicus* vad típusú (7-1), (D-F) *sep1<sup>Sj::ura4<sup>+</sup></sup>* (7-254) (G-I) *ace2<sup>Sj::ura4<sup>+</sup></sup>* (7-258) sejtek mikroszkópi morfológiája. 'A, D, G': fáziskontraszt felvétel 'B, E, H': calcofluorral festett sejtek mikroszkópi megjelenése, 'C, F, I': DAPI-val festett sejtek mikroszkópi fotói.

#### 4.3.1.1.2. A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj::ura4<sup>+</sup></sup>* törzs morfológiai vizsgálata

A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj::ura4<sup>+</sup></sup>* (7-258) törzs mikroszkópos vizsgálatai szilárd MMA+kiegészítő táptalajon 30 °C-on történő egy éjszakán át tartó tenyésztés után történtek. A sejteket calcofluor és DAPI festéssel is megvizsgáltuk (38/G, H, I. ábrák). A képekből látható, hogy összehasonlítva a vad típusú törzssel (7-1), amelynek hengeres sejtjei vannak, és osztódáskor egy szeptumot tartalmaznak (38/A, B, C. ábra), az *ace2<sup>Sj::ura4<sup>+</sup></sup>* *Sch.*

*japonicus* (7-258) sejtjei elágazó láncokat alkotnak (38/G ábra). Calcofluoros festéssel (38/H ábra) látható, hogy több szeptumot, DAPI festéssel (38/I ábra) pedig, hogy több sejtmagot tartalmaznak ezek a láncok. Ez a fenotípus hasonló a *Sch. pombe ace2Δ* (2-1043) fenotípusához (39/G, H, I ábra). Tehát azt feltételezhetjük, hogy az Ace2p transzkripciósfaktor szerepe hasonló a két rokon fajban, mindkettőben részt vesz a sejtszeparáció szabályozásában.

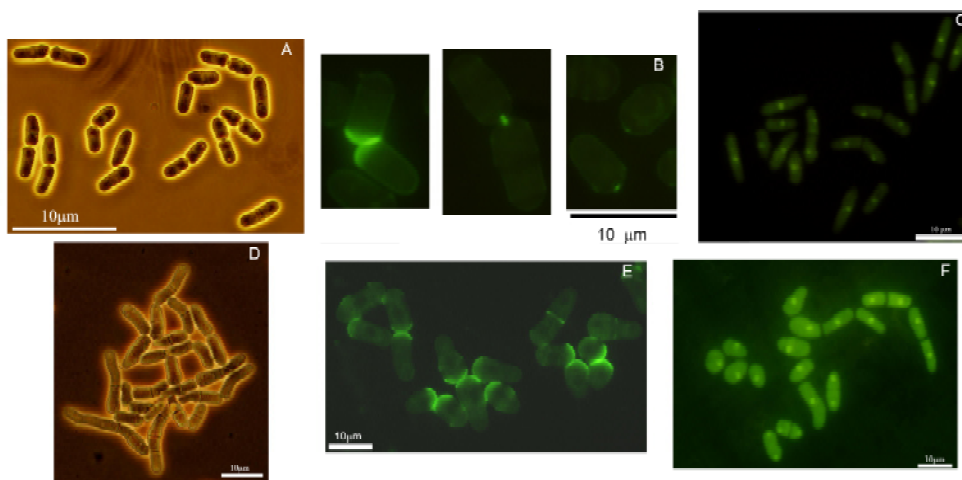


**39. ábra**

A (A-C) *Sch. pombe* vad típusú (0-1), (D-F) *sepI* mutáns (2-1407) (G-I) és *ace2Δ* (2-1043) sejtek mikroszkópi morfológiája. 'A, D, G': fáziskontraszt felvétel; 'B, E, H': calcofluorral festett sejtek mikroszkópi megjelenése, 'C, F, I': DAPI-val festett sejtek mikroszkópi fotói.

#### 4.3.1.1.3. A *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* törzs morfológiai vizsgálata

A *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) törzs mikroszkópos vizsgálatai szilárd MMA+kiegészítő táptalajon történt egy éjszakán át tartó 30 °C-os tenyésztés után. A sejteket fáziskontraszt mikroszkópiával (**40/A ábra**) vizsgálva látható, hogy a fenotípus nem olyan mértékben láncos, mint a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* és *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* törzsek esetében (**38/D-I ábra**), a sejteket nehezen lehet megkülönböztetni a vad típusú *Sch. japonicus* (7-1) sejtektől (**38/A-C ábra**). A *eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) sejtek néhol befűződéseik révén kapcsolódnak egymáshoz. Ez a fenotípus hasonló az *eng1Δ Sch. pombe* (2-1401) mutáns fenotípusához (**40/A-C ábra**), ahol a sejtek nem képesek elbontani az elsődleges szeptumot [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003], ezért osztódás után együttmaradnak.



**40. ábra**

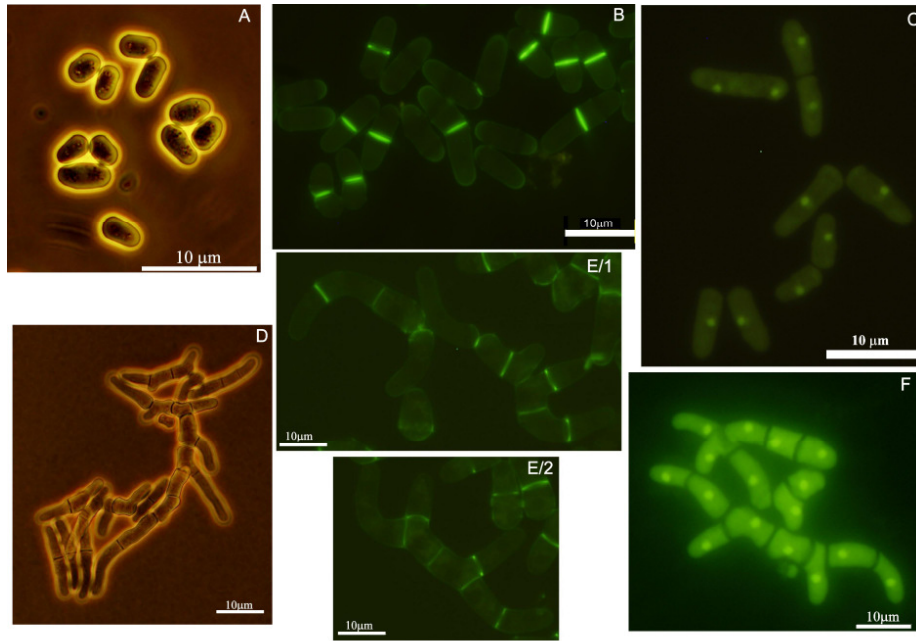
A (A-C) *Sch. pombe eng1Δ* (2-1401), (D-F) és *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) sejtek mikroszkópi morfológiája: 'A' és 'D': fáziskontraszt felvétel; 'B' és 'E': calcofluorral festett sejtek mikroszkópi megjelenése, 'C' és 'F': DAPI-val festett sejtek mikroszkópi fotói.

Egyes calcofluorral festett *eng1Δ Sch. pombe* (2-1401) (**40/B ábra**) és *eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* *Sch. japonicus* (7-255) (**40/E ábra**) sejteken látszik, hogy megfestődik a sejtek szélén az elsődleges szeptum, amelyet nem tudnak feloldani az Eng1p enzim hiányában. A calcofluor a  $\beta$ -glukánt teszi láthatóvá, amely az elsődleges szeptumban található nagy mértékben, kisebb mennyiségben a sejtfa is tartalmazza, míg a másodlagos szeptumban nem fordul elő

[Johnson és mtsai, 1973]. Az Eng1p protein az elsődleges szeptum elbontásáért felelős, ami annak hiányában nem tud lebomlani, de valószínű, hogy spontán is feloldódik, ugyanis Sipiczki és Bozsik (2000) leírták, hogy mechanikailag széttördelt *Sch. pombe sep1* mutánsoknál a sejt falon maradt elsődleges szeptum calcofluor festődése az idővel eltűnik, tehát az önmagától is eliminálódik. Tehát az Eng1p nem esszenciális a *Sch. pombe* sejtszeparációjában, nem jellemző a szét nem vált sejtek többsége a mutáns fenotípusnál. A DAPI-val festett *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) sejtekben látható, hogy egy-egy sejt magot tartalmaznak (**40/F ábra**). Ezek alapján elmondható, hogy az Eng1p protein szerepe hasonló lehet a két rokon fajban, hiányában nem képesek elbontani az elsődleges szeptumot.

#### 4.3.1.1.4. A *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>Δ* törzs morfológiai vizsgálata

A *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>Δ* (7-256) törzs mikroszkópos vizsgálatai szilárd MMA+kiegészítő táptalajon történtek 30 °C-on egy éjszakán át tartó tenyésztés után. A sejteket fáziskontraszt mikroszkópiával, calcofluor és DAPI festéssel is megvizsgáltuk (3.7. fejezet). A képeken látható, hogy összehasonlítva a vad típusú törzssel (7-1) (**38/A-C. ábra**), melynek sejtjei hengeresek és maximum egy szeptumot tartalmaznak, az *agn1<sup>Sj</sup>* mutáns *Sch. japonicus* sejtjei (7-256) hasonlóan a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-254) és *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* *Sch. japonicus* (7-256) mutánsokhoz (**38/D-I. ábra**), elágazó láncokat alkotnak, több szeptummal, a sejtek nem képesek elválni egymástól. A calcofluor láthatóvá teszi a több szeptumot a láncokon belül (**41/E. ábrák**), míg a DAPI a több sejt magot (**41/F. ábra**). Ez a fenotípus szembetűnőbb, mint a *Sch. pombe agn1Δ* (2-1402) mutáns fenotípusa (**41/A-C. ábra**), ahol a sejtek legfeljebb párokban állnak, [Dekker és mtsai, 2004; Garcia és mtsai, 2005]. Feltételezhető, hogy a *Sch. pombe*-ben más enzimek is részt vehetnek a szeptum lebontásában az Eng1p-en és Agn1p-en kívül, ezért nem mutatnak a *sep1Δ* és *ace2Δ*-hoz hasonló fenotípust az *agn1<sup>Sj</sup>* mutáns sejtek. Ugyanakkor a *Sch. japonicus*-ban az Agn1p-nek nagy szerepe lehet a sejt fal elbontásában osztódó sejtek között mert a mutáns fenotípus a szabályozó gének (*ace2<sup>Sj</sup>*, *sep1<sup>Sj</sup>*) mutáns fenotípusához hasonló.



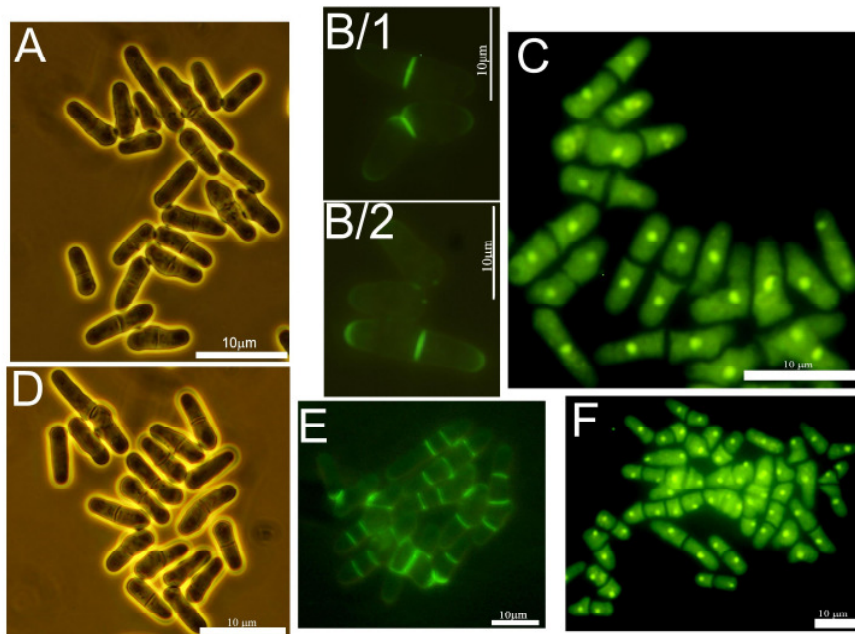
**41. ábra**

A (A-C) *Sch. pombe agn1Δ* (2-1402), (D-F) és *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>Δ* (7-256) sejtek mikroszkópi morfológiája: 'A' és 'D': fáziskontraszt felvétel; 'B' és 'E': calcofluorra festett sejtek mikroszkópi megjelenése, 'C' és 'F': DAPI-val festett sejtek mikroszkópi fotói.

#### 4.3.1.1.5. A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>Δ* morfológiai vizsgálata

A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>Δ* (7-260) törzs mikroszkópos vizsgálatai szilárd MMA+kiegészítő táptalajon történtek egy éjszakán át tartó 30 °C-os tenyésztés után. A sejteket fáziskontraszt mikroszkópiával (**42/D. ábra**) vizsgálva látható, hogy a fenotípus nem olyan mértékben láncos, mint a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* és *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* törzsek (**38/D-I. ábra**) esetében, a sejtek első ránézésre nem különböznek sokat a vad típusú *Sch. japonicus* (7-1) sejtektől (**38/A-C. ábra**). A sejtek néhol befűződés révén kapcsolódnak egymáshoz, ritkán két szeptumot tartalmaznak. Ez a fenotípus hasonló a *Sch. pombe mid2Δ* (2-1403) mutáns fenotípusához (**42/A-C. ábra**) annyiban, hogy azok is befűződés révén kapcsolódnak egymáshoz, a szeptum elbontása a sejtseparáció során tökéletlen, mert az Eng1p és Agn1p enzimek lokalizációja nem megfelelő a Mid2p fehérje szeptingyűrű stabilizáló hatásának hiányában [Tasto és mtsai, 2003; Martin-Cuadrado és mtsai, 2005]. A calcofluorral festett *Sch. pombe mid2Δ* (2-1403) és *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>Δ* (7-260) sejteken (**42/B és E. ábra**)

látszik, hogy sejtek szélén az elsődleges szeptum megfestődik, amelyet nem tudnak feloldani az Eng1p enzim valószínűleg hibás lokalizációja miatt. A *Sch. pombe*-ben az Eng1p protein az elsődleges szeptum elbontásáért felelős [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003], hiányában elvileg nem tud lebomlani, de valószínű, hogy spontán is feloldódik [Sipiczki és Bozsik, 2000], ezért nem jellemző az el nem vált sejtek többsége a mutáns fenotípusnál. A *Sch. pombe* Mid2p fehérje hiányában az Agn1p enzim is elégtelenül működik [Tasto és mtsai, 2003, Martin-Cuadrado és mtsai, 2005]. A *Sch. pombe* esetében azt valószínűsítjük, hogy az Agn1p-en kívül van egy másik 1, 3  $\alpha$ -glukanáz, ami Agn1p hiányában is elvégzi a sejtek közötti sejtfal elbontását, ezért nem annyira nyilvánvaló az *agn1<sup>-</sup>* mutáns fenotípus (4.3.1.1.4. fejezet). A *Sch. japonicus* esetében az *agn1<sup>Sj</sup> $\Delta$*  mutáció láncos fenotípussal rendelkező sejteket eredményez (4.3.1.1.4. fejezet), tehát valószínű, hogy a fehérjének fontosabb a szerepe, mint a *Sch. pombe*-ben. Ez magyarázhatja, hogy a *mid2<sup>-</sup>* mutáció miatt is nagyobb a két vagy több szeptumos sejtláncok aránya (**42/D-F. ábra**), mint a *Sch. pombe*-ben (**42/A-C. ábra**).

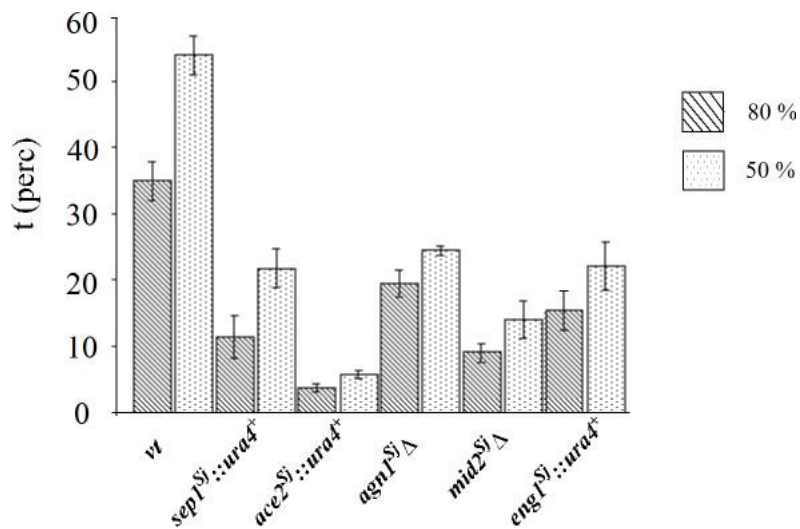


**42. ábra**

A (A-C) *Sch. pombe mid2Δ* (2-1403), (D-F) és *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>Δ* (7-260) sejtek mikroszkópi morfológiája: 'A' és 'D': fáziskontraszt felvétel; 'B' és 'E': calcofluorral festett sejtek mikroszkópi megjelenése, 'C' és 'F': DAPI-val festett képek mikroszkópi fotói.

#### 4.3.1.2. *Sch. japonicus* mutánsok szedimentációjának vizsgálata

A sejtláncokat tartalmazó sejtenyészetek hamarabb ülepednek, mint az egyedi sejteket tartalmazóak [Dekker és mtsai, 2004]. Megvizsgáltuk az általunk létrehozott mutánsok szedimentációját. A **43. ábrán** látható, hogy a különféle mutánsok és a vad típusú (7-1) *Sch. japonicus* sejtek kezdeti ( $OD_{590}=1$ ) abszorbanciája mennyi idő alatt csökken a 80 illetve 50%-ára. Látható, hogy a *Sch. japonicus*  $ace2^{Sj}::ura4^+$  (7-258) abszorbanciája csökken a leggyorsabban, a  $sep1^{Sj}::ura4^+$  (7-254),  $agn1^{Sj} \Delta$  (7-256),  $mid2^{Sj} \Delta$  (7-260),  $eng1^{Sj}::ura4^+$  (7-255) törzseké egymáshoz közel hasonló sebességgel csökken, de a vad típusú (7-1) törzsnél gyorsabban. Ez az eredmény azt támasztja alá, hogy a *Sch. japonicus* mutánsokban sejtláncok vannak, amelyek gyorsabban ülepednek a vad típusúhoz (7-1) képest.

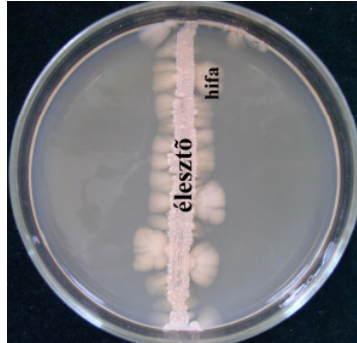


**43. ábra**

A vad típusú (7-1) és  $sep1^{Sj}::ura4^+$  (7-254),  $ace2^{Sj}::ura4^+$  (7-258),  $agn1^{Sj} \Delta$  (7-256),  $mid2^{Sj} \Delta$  (7-260),  $eng1^{Sj}::ura4^+$  (7-255) *Sch. japonicus* törzsek szedimentációs vizsgálata.

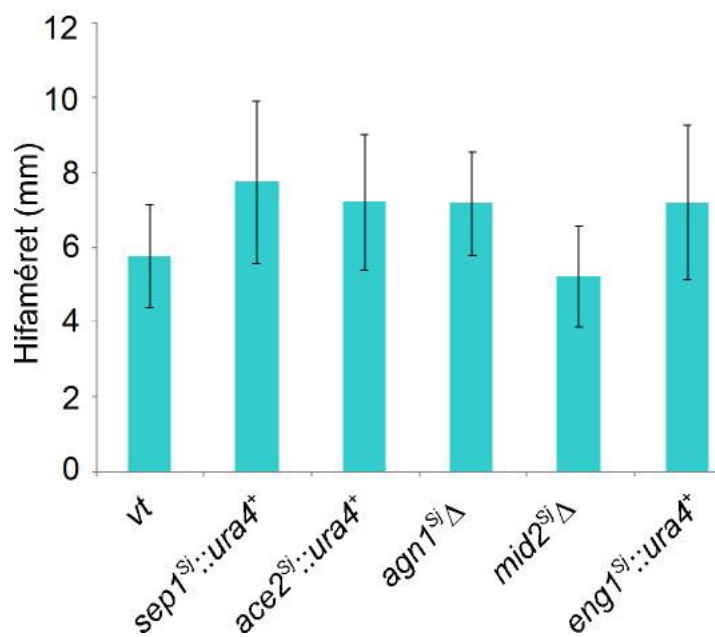
#### 4.3.2. A mutánsok fenotípusa a micéliumos fázisban

A *Sch. japonicus* szilárd táptalajon 8-10 nap elteltével unipolárisan növekvő hifákat (44. ábra) képez [Sipiczki és mtsai, 1998].



44. ábra

A vad típusú (7-1) *Sch. japonicus* hifás növekedése YEA táptalajon 12 nappal a leoltás után.



45. ábra

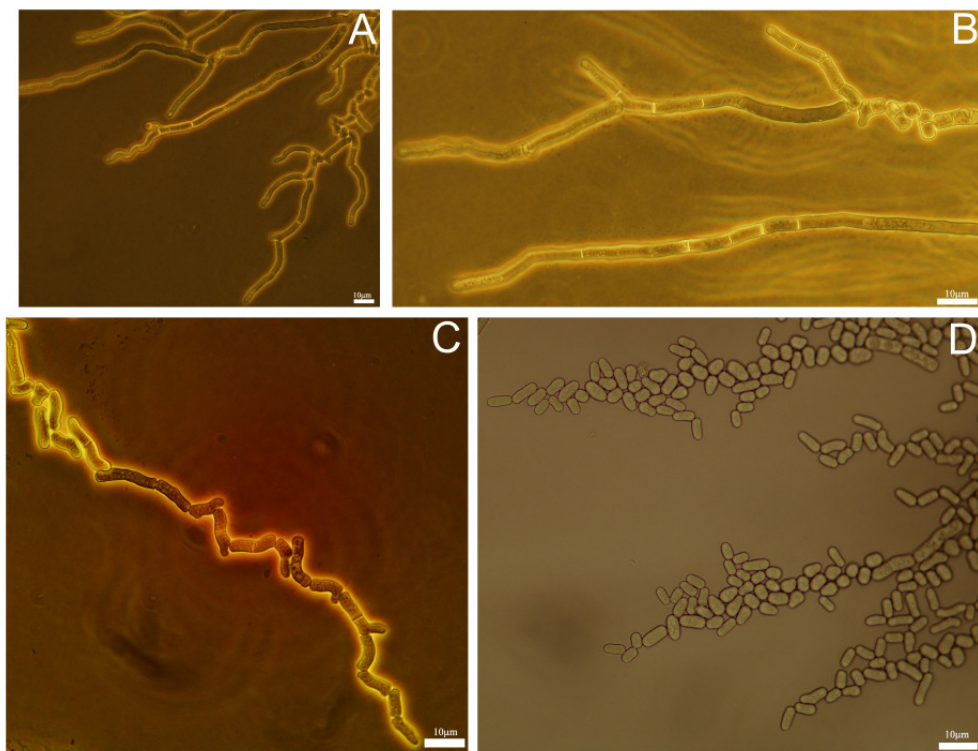
A *Sch. japonicus* vad típusú és *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>*, *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>*, *eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>*, *agn1<sup>Sj</sup>Δ*, *mid2<sup>Sj</sup>Δ* törzsek hifamérete 12 nap elteltével a leoltás után YEA táptalajon.

Megvizsgáltuk, hogy a mutációk hatással vannak-e az élesztő és micéliumos fázisok közötti átváltásra és a micéliumok növekedésére illetve morfológiájára. Az élesztő-micélium átváltás időzítése és a micélium növekedési sebességének érdekében thiamine-nal kiegészített YEA táptalajra oltottuk a vad és a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-254), *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-258) *agn1<sup>Sj</sup>Δ* (7-256), *mid2<sup>Sj</sup>Δ*(7-260), *eng1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) mutáns törzseket csík formájában. A csészéket naponta ellenőrizve megállapítottuk, hogy nem volt számottevő különbség sem a micéliális fázis megjelenésének időpontjában sem annak növekedési sebességében a vad és a mutánsok között (**45. ábra**). Minden törzsnél 6-7 nap múlva volt először látható invazív micélium a felületen növekedő élesztő alatt és minden törzs esetében átlagban 6-7 mm szélességű micéliumot lehetett látni 12 nap elteltével.

#### **4.3.2.1. A *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata**

A hifák létrejöttét a nitrogén éhezés váltja ki, mindig a táptalaj nitrogénben gazdagabb részei felé nőnek. Ha nitrogén forrást juttattunk a hifák közelébe, azok abbahagyják a megnyúlást, feldarabolódnak és visszatérnek az élesztőfázisba, ahol ismét bipolárisan növekednek [Sipiczki és mtsai, 1998]. A *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-254) mutáns (**47/A. ábra**) is képez hifákat, amelyek a vad típusú (7-1) törzs hifáihoz (**46/A. ábra**) hasonlóan nőnek, mindig a szeptum alatt ágaznak el, újabb hifákat képezve. Tehát a *sep1<sup>Sj</sup>* gén inaktiválása nem befolyásolja az élesztő-hifa átváltást és a hifanövekedést.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a *sep1<sup>Sj</sup>* inaktiválása befolyásolja-e a hifák feldarabolódási képességét. Azt tapasztaltuk, a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* mutáns (7-254) is szeptumokat hoz létre nitrogén hozzáadására a hifáiban, ugyanúgy, mint a vad törzs (**46/B. ábra**). A vad típusú törzs hifái teljesen feldarabolódnak (**46/D. ábra**), miután visszatérnek az élesztőfázisra jellemző növekedésre (**46/C. ábra**). A *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* mutánsban viszont a szeptálódást nem követi a szeptumok feloldódása. A feldarabolódás elmaradása ellenére a sejtek visszatérnek az élesztő stádiumra jellemző bipoláris növekedésre. Erre abból lehet következtetni, hogy a közöttük levő szeptumoknál oldalra kinőnek, mégpedig mindkét végüknél (**47/C és D. ábra** piros nyilakkal vannak jelölve). Az utóbbi az unipoláris hifáknál nem következik be [Sipiczki és mtsai, 1998]. Azok mindig csak az egyik végükön tudnak nőni. A későbbiek során egyes szeptumoknál bekövetkezik hasadás, azaz a hifa helyenként feldarabolódik, ez azonban már annak köszönhető, hogy a bipolárisan növekedő sejtek végei egymásnak feszülve fizikailag hasítják a szeptumokat (**31/E, F. ábra**).



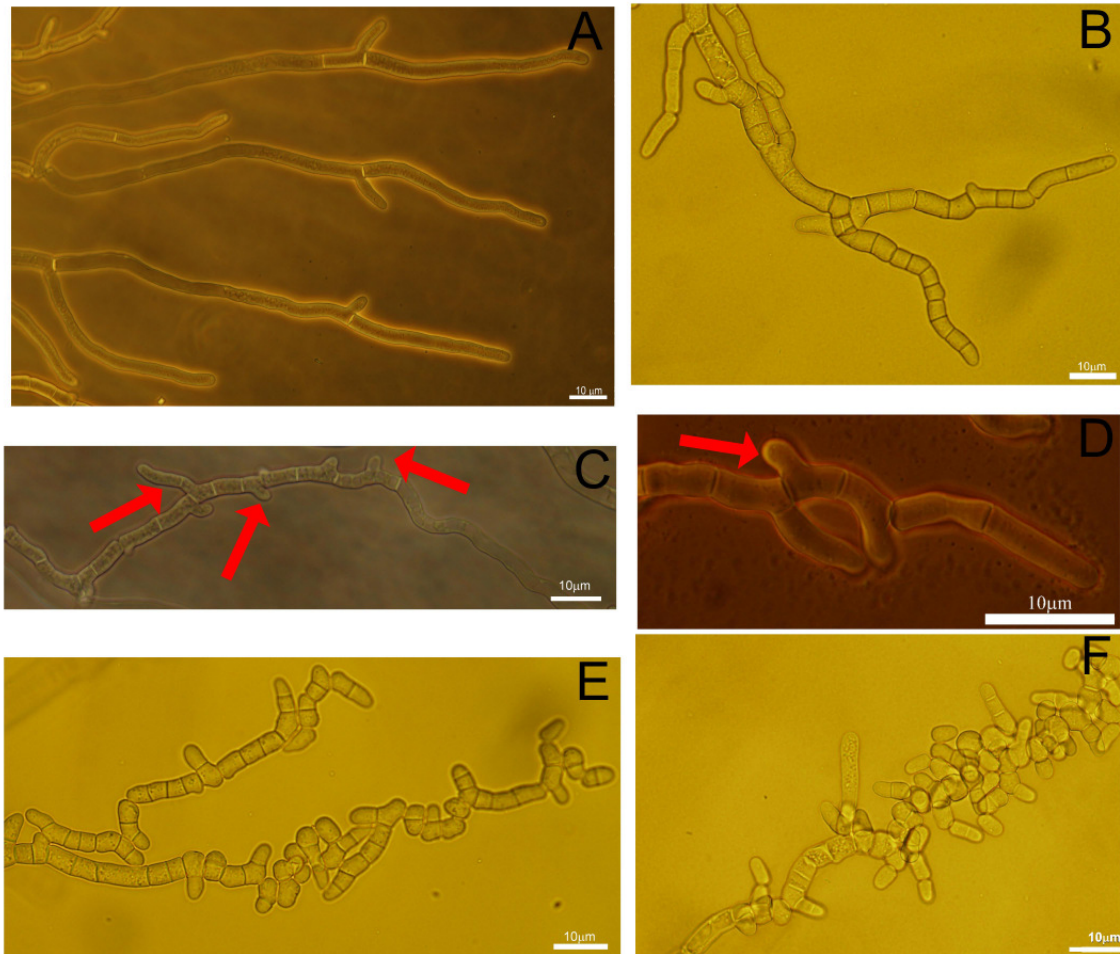
**46. ábra**

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

#### 4.3.2.2. A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata

A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-258) törzs sejtláncokat tartalmaz (4.3.1.1.2 fejezet) az élesztőfázisban, a sejtek nem képesek elbontani a szeptumot a sejtseparációhoz. Ennél a mutáns törzsnél is megvizsgáltuk, hogy ennek a képességnek hiánya okoz-e változásokat hifás formából élesztő fázisba való átváltáskor friss táptalaj hozzáadására. Ugyanazt tapasztaltuk, mint a *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* törzs hifái esetében. A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-258) hifa (48/A. ábra) nitrogén hozzáadása nélkül a vad típusú (7-1) törzs hifáihoz (48/A. ábra) hasonlóan nő, elágazások mindig a szeptumok alatt alakulnak ki. Azt tapasztaltuk, hogy a vad típus képes a hifáit feldarabolni (46/D. ábra), míg az *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* mutáns (7-258) először szeptumokat képez (48/B. ábra), majd visszatér a bipoláris növekedésre anélkül, hogy a szeptumait feloldaná úgy, hogy a hifa kihajt a növekedéssel ellentétes irányban is (48/C, D, ábrák piros nyilakkal vannak jelölve). A hifa időközönkénti feldarabolódása valószínűleg a mechanikai feszültség hatására következik be

(48/E és F. ábra), amely nem azonos a szeptum elbontásából származó darabolódással, ami a vad típusnál (46/D. ábra) jelenik meg.



#### 47. ábra

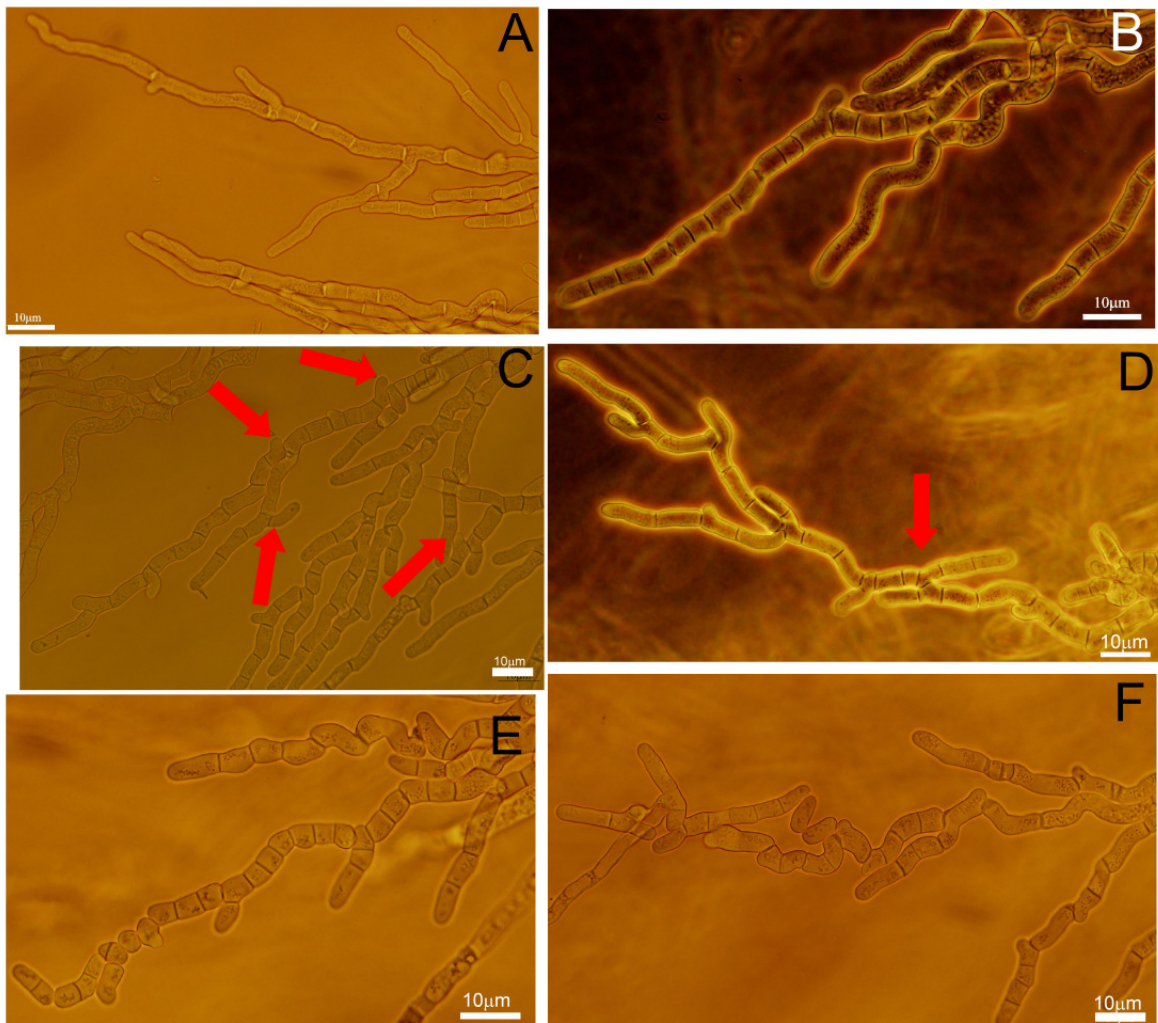
A *Sch. japonicus* *sep1<sup>Si</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-254) hifa növekedése (A) hozzáadott nitrogén forrás nélkül; illetve (B-F) nitrogén hozzáadása után. Piros nyilakkal vannak jelölve azok a helyek, ahol a hifa a növekedéssel ellentétes irányban is kihajt (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi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

#### 4.3.2.3. A *Sch. japonicus engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata

A *Sch. japonicus engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) sejtek néhol befűződésekkkel kapcsolódnak egymáshoz (4.3.1.1.3. fejezet), ahol a sejtek nem képesek elbontani az elsődleges szeptumot a sejtseparációhoz. Megvizsgáltuk, hogy ennek a képességnek a hiánya megjelenik-e hifás formából élesztő fázisba való átváltáskor nitrogén forrás (YEL tápoldat) hozzáadására. A *Sch. japonicus engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) hifa (**49/A. ábra**) nitrogén hozzáadása nélkül a vad típusú törzs (7-1) hifáihoz (**46/A. ábra**) hasonlóan nő, elágazások mindig a szeptumok alatt alakulnak ki. Mint korábban láttuk, hogy a vad típus (7-1) képes a hifáit feldarabolni (**46/D. ábra**), míg az *engI<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) mutáns először szeptumokat képez (**49/B. ábra**), majd visszatér a bipoláris növekedésbe anélkül, hogy feloldaná a szeptumait, úgy hogy a hifa kihajt a növekedéssel ellentétes irányban a szeptum felett is (**49/C és D. ábra** piros nyilakkal vannak jelölve). A hifa feldarabolódása végül teljesen bekövetkezik (**49 F és G. ábra**), de a sejtek befűződéseken keresztül kapcsolatban maradnak egymással, valószínűleg azért, mert szilárd táptalajon az elsődleges szeptum nem tud feloldódni, míg vizes közegben spontán eliminálódik [Sipiczki és Bozsik, 2000].

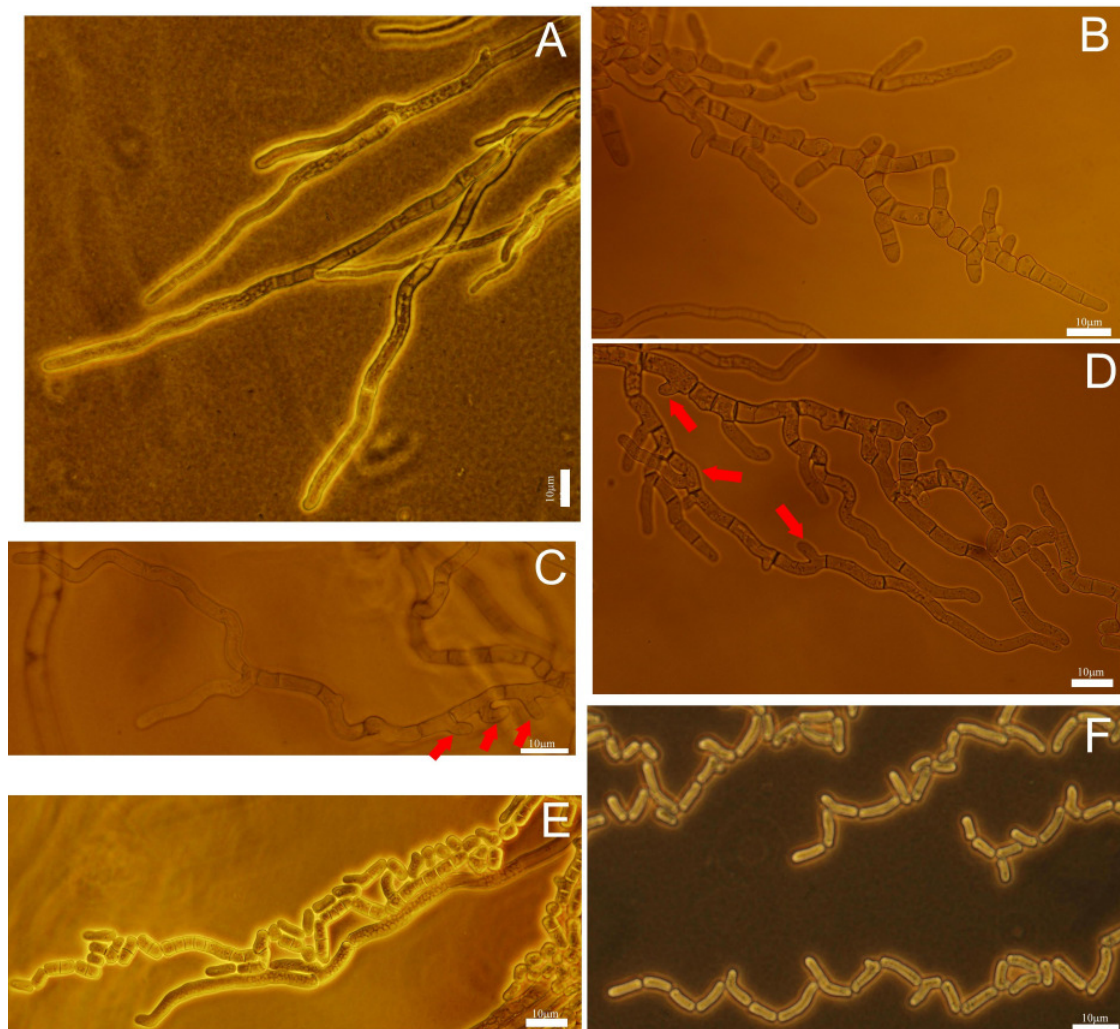
#### 4.3.2.4. A *Sch. japonicus agnI<sup>Sj</sup>Δ* hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata

A *Sch. japonicus agnI<sup>Sj</sup>Δ* (7-256) élesztősejtek hifás fenotípust mutattak (4.3.1.1.4. fejezet), a sejtek nem képesek elbontani az anyasejt falát a sejtseparációhoz. A *Sch. japonicus agnI<sup>Sj</sup>Δ* (7-256) nitrogén hozzáadása nélkül növekedő hifái az **50/A.** ábrán láthatóak. A hifák a vad típusú törzs (7-1) hifáihoz (**46/A. ábra**) hasonlóan nőnek, mindig a szeptum alatt ágaznak el, újabb hifákat képezve. Megvizsgáltuk, hogy az anyasejt falának lebontási defektusa megjelenik-e hifa formából élesztő fázisba való átváltáskor nitrogén forrás hozzáadására. A vad típus képes (7-1) a hifáit feldarabolni (**46/D. ábra**), míg az *agnI<sup>Sj</sup>Δ* mutáns (7-256) először szeptumokat képez (**50/B. ábra**), majd visszatér a bipoláris növekedésre, anélkül, hogy a sejtek szétválának a szeptumoknál (**50. ábra** piros nyilakkal vannak jelölve), a hifa kihajt a szeptum felett is, a hifa növekedéssel ellentétes oldalon. A hifa feldarabolódása végül bekövetkezik (**50/F. ábra**), valószínűleg a mechanikai feszültség hatására.



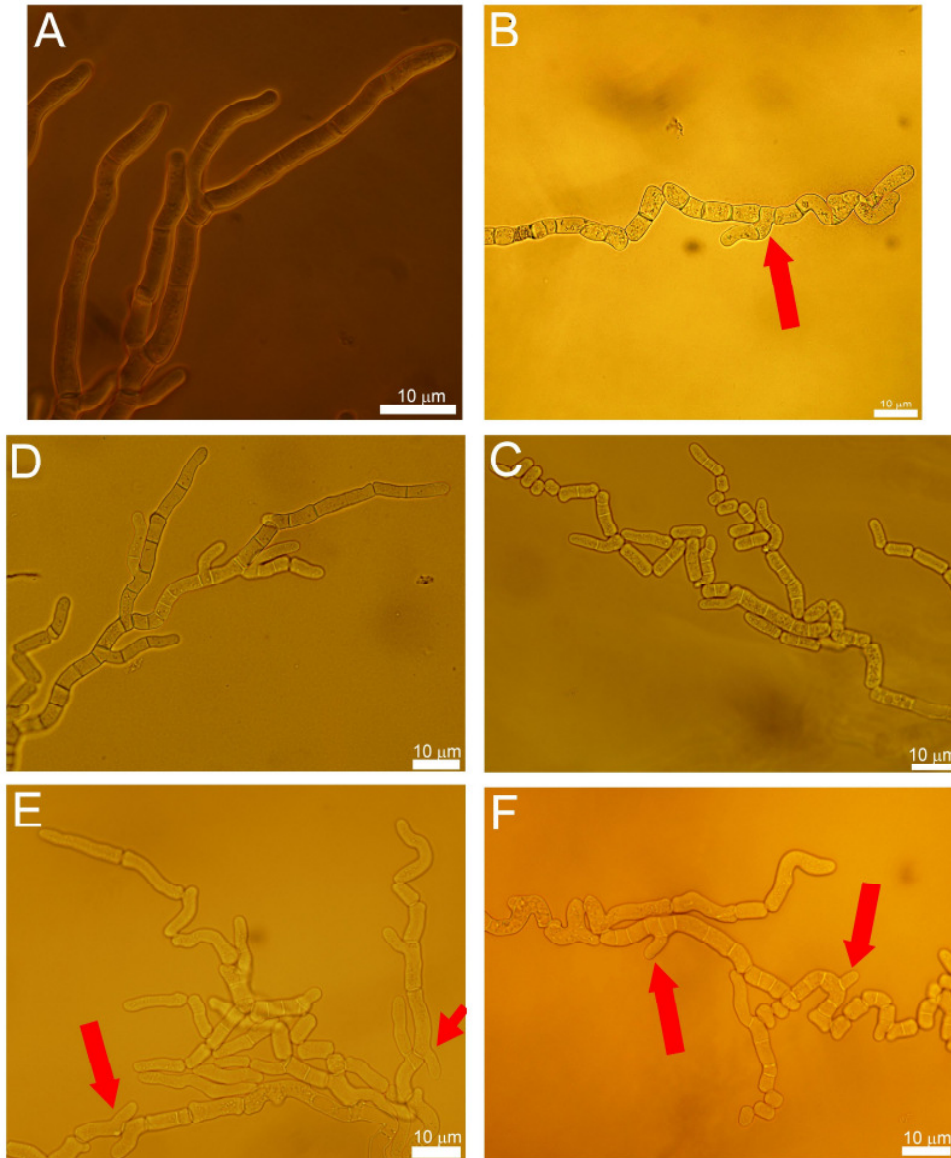
**48. ábra**

A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-258) hifa növekedése (A) hozzáadott nitrogénforrás nélkül és (B-F) nitrogén hozzáadása után. Piros nyilakkal vannak jelölve azok a helyek, ahol a hifa a növekedéssel ellentétes irányban is kihajt (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).



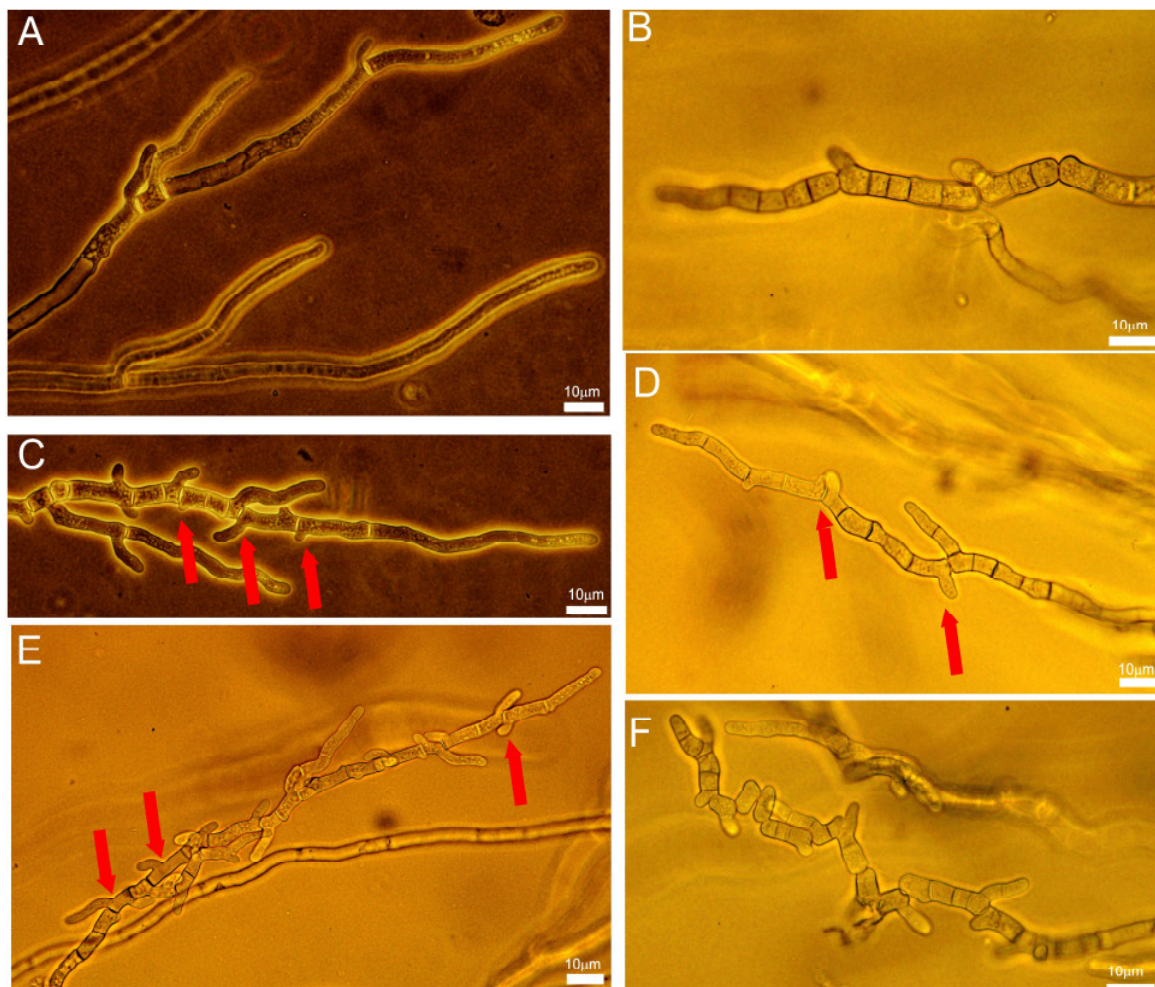
**49. ábra**

A *Sch. japonicus eng1<sup>Si</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-255) hifák növekedése (A) nitrogén forrás hozzáadása nélkül és (B-F) nitrogén forrás hozzáadása után. Piros nyilakkal vannak jelölve azok a helyek, ahol a hifa a növekedéssel ellentétes irányban is kihajt (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).



**50. ábra**

A *Sch. japonicus agn1<sup>Si</sup>Δ* (7-256) hifák növekedése (A) nitrogén forrás hozzáadása nélkül és (B-F) nitrogén forrás hozzáadása után. Piros nyilakkal vannak jelölve azok a helyek, ahol a hifa a növekedéssel ellentétes irányban is kihajt (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).



**51. ábra**

A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>Δ* (7-260) hifák növekedése (A) nitrogén forrás hozzáadása nélkül és (B-F) nitrogén forrás hozzáadása után. Piros nyilakkal vannak jelölve azok a helyek, ahol a hifa a növekedéssel ellentétes irányban is kihajt (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).

#### 4.3.2.5. A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>Δ* hifaképzésének és hifa darabolódásának vizsgálata

A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>Δ* (7-260) élesztősejtek néhol befűződésekkkel kapcsolódnak egymáshoz (4.3.1.1.5. fejezet), ahol a sejtek nem képesek elbontani a szeptumot a sejtszeparációhoz. Ennél a törzsnél is megvizsgáltuk, hogy ennek a képességnek a hiánya

megjelenik-e hifás formából élesztő fázisba való átváltáskor nitrogén forrás (YEL tápoldat) hozzáadására. A *Sch. japonicus mid2<sup>Sj</sup>Δ* (7-260) hifa (**51/A. ábra**) nitrogén hozzáadása nélkül a vad típusú törzs (7-1) hifáihoz (**46. ábra**) hasonlóan nő, elágazások mindig a szeptumok alatt alakulnak ki (**46. ábra**). Nitrogén hozzáadása után a *mid2<sup>Sj</sup>Δ* mutáns (7-260) hifája először szeptumokat képez (**51/B. ábra**), majd visszatér a bipoláris növekedésbe, anélkül, hogy teljesen feldarabolódott volna, úgy hogy a hifa kihajt a növekedéssel ellentétes irányban a szeptum felett is (**51. ábra**, piros nyilakkal vannak jelölve). A hifa feldarabolódása végül teljesen bekövetkezik (**51/F. ábra**), valószínűleg a mechanikai feszültség hatására.

#### 4.4. A *Sch. japonicus* gének funkcionális tesztelése a *Sch. pombe*-ben

##### 4.4.1. Expressziós konstrukciók létrehozása

###### 4.4.1.1. A *sep1<sup>Sj</sup>* expressziós konstrukciók létrehozása

A *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>* gént *NdeI* és *SalI* enzimekkel kivágtuk (3.5.4. fejezet) a pJET 1.2.-*sep1<sup>Sj</sup>* vektorból, és klónoztuk (3.5.5. fejezet.) ugyanezekkel a hasítóhelyekkel a pREP1, pREP41, pREP81 expressziós vektorsorozatba (3.2. fejezet; **16. ábra**). A kapott plazmidokkal a *Sch. pombe sep1Δ leu1* (2-1407) törzs transzformálását elektroporátoros módszerrel végeztük a 3.5.6. fejezet leírása szerint. A transzformánsokat EMMA táptalajon növesztettük. Azok a telepek nőttek ki, amelyek felvették a *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>* génjét tartalmazó plazmidot és ezáltal komplementálni tudták a *leu1* mutációt.

###### 4.4.1.2. Az *ace2<sup>Sj</sup>* expressziós konstrukciók létrehozása

A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* gént *NdeI* és *SalI* enzimekkel kivágtuk a pJET 1. 2.-*ace2<sup>Sj</sup>* vektorból (3.5.4. fejezet), és ligáltuk (3.5.5. fejezet) a pREP2; pREP42; pREP82 expressziós vektorsorozatba (3.2. fejezet; **16. ábra**). A kapott plazmidokkal a *Sch. pombe ace2Δ* (2-1043) transzformálását elektroporátoros módszerrel végeztük (3.5.6. fejezet). A transzformált sejtek szélesztése EMMA minimál táptalajra történt. Azok a telepek, amelyek kinőttek, felvették a *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génjét tartalmazó plazmidot, mert a rajta levő *ura4<sup>+</sup>* gén komplementálta a transzformált törzs *ura4<sup>-</sup>* mutációját.

#### 4.4.1.3. Az *engI<sup>Sj</sup>* expressziós konstrukciók létrehozása

A *Sch. japonicus engI<sup>Sj</sup>* gént *BamHI* enzimmel kivágtuk (3.5.4. fejezet) a pUC18-*engI<sup>Sj</sup>* (3.3. fejezet) vektorból, és ligáltuk (3.5.5. fejezet) a pREP2; pREP42, pREP82 expressziós vektorsorozatba (3.2. fejezet; **16. ábra**). Az így létrehozott vektorokkal transzformáltuk az *Sch. pombe engIΔ* törzset (2-1401) elektroporátoros módszerrel a 3.5.6. fejezetben leírtak alapján. A transzformánsokat EMMA táptalajon növesztettük, s a kinőtt telepeket vizsgáltuk, ugyanis azok vették fel a plazmidot, melyen levő *ura4<sup>+</sup>* gén komplementálta a transzformált törzs *ura4<sup>-</sup>* mutációját.

#### 4.4.1.4. Az *agnI<sup>Sj</sup>* expressziós konstrukciók létrehozása

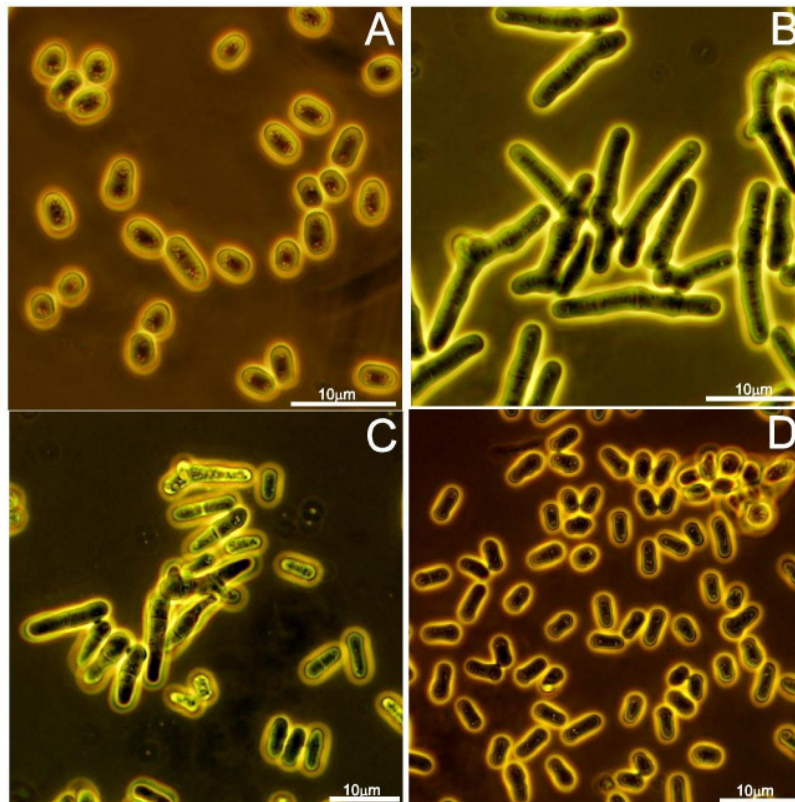
Az *agnI<sup>Sj</sup>* gént *BamHI* és *SmaI* enzimekkel kivágtuk (3.5.4. fejezet) a pJET 1.2.-*agnI<sup>Sj</sup>* vektorból, és ligáltuk (3.5.5. fejezet) a pREP2; pREP42; pREP82 expressziós vektorsorozatba (3.2. fejezet; **16. ábra**). Az így létrehozott pREP2-*agnI<sup>Sj</sup>*, pREP42-*agnI<sup>Sj</sup>*, pREP82-*agnI<sup>Sj</sup>* vektorokkal és az üres pREP2, pREP42, pREP82 plazmidokkal transzformáltuk az *Sch. pombe agnIΔ* (2-1402) törzset elektroporátoros módszerrel a 3.5.7. fejezet leírása alapján. Az EMMA táptalajon kinőtt telepeket megvizsgáltuk, ugyanis ezek tartalmazták a plazmidot, melyen levő *ura4<sup>+</sup>* gén komplementálta a transzformált törzs *ura4<sup>-</sup>* mutációját.

#### 4.4.2. *Sch. pombe* mutációk komplementálása *Sch. japonicus* géneket tartalmazó expressziós plazmidokkal

##### 4.4.2.1. A *sepI<sup>Sj</sup>* komplementáló hatásának vizsgálata

A transzformánsokat megvizsgáltuk mikroszkóppal (3.7.3. fejezet) EMMA minimál táptalajon tenyésztés után. A morfológiai különbségek az **52. ábrán** láthatóak a vad típusú *Sch. pombe* sejtekhez képest. (**52/A. ábra**). Az üres pREP plazmidokkal (pREP1, pREP41, pREP,81) transzformált *sepI<sup>-</sup>* sejtek (86, 88, 94-es transzformánsok) nem különböznek a *sepI<sup>-</sup>* mutánstól (2-1407, **39. ábra**): a sejtek láncokat alkotnak, sejtosztódás után együttmaradnak (**52/B. ábra**). A *sepI<sup>Sj</sup>* közepes és gyenge erősségű expressziós vektorokkal transzformált törzsek fenotípusában nincs számottevő különbség. A pREP41-*sepI<sup>Sj</sup>*, pREP81-*sepI<sup>Sj</sup>* vektorok expressziója mellett megfigyelhető, hogy a *sepI<sup>-</sup>* mutáns fenotípus csökken, a sejtek kevésbé alkotnak láncokat, egyedi sejtek fordulnak elő többnyire a

tenyésztetben (52/D. ábra). A *sep1<sup>Sj</sup>* legerősebb vektor (pREP1) expressziójával megfigyeltük a sejtek lízálását, életképességük csökkenését hosszabb ideig történő thiamine mentes táptalajon történő tenyésztést követően (52/C. ábra). Blast programmal (3.8. fejezet) összehasonlítottuk a *Sch. japonicus* és a *Sch. pombe* Sep1p fehérjéinek szekvenciáját (4.1.2. fejezet). Azt tapasztaltuk, hogy az egész proteinre vonatkozó hasonlóság kicsi, mindössze 29%. A fork-head domén gyakran előfordul sok organizmus transzkripció faktorjában [Weigel és mtsai, 1989], amelyek a legkülönbözőbb szabályozásokban vesznek részt. Valószínűleg a 2 faj proteinje közötti szekvencia hasonlóság nem elegendő a tökéletes komplementációhoz, ugyanis az csak egy változatos feladatot ellátó doménre korlátozódik.



52. ábra

**A *Sch. pombe sep1* mutációjának komplementálása *sep1<sup>Sj</sup>*-vel.**

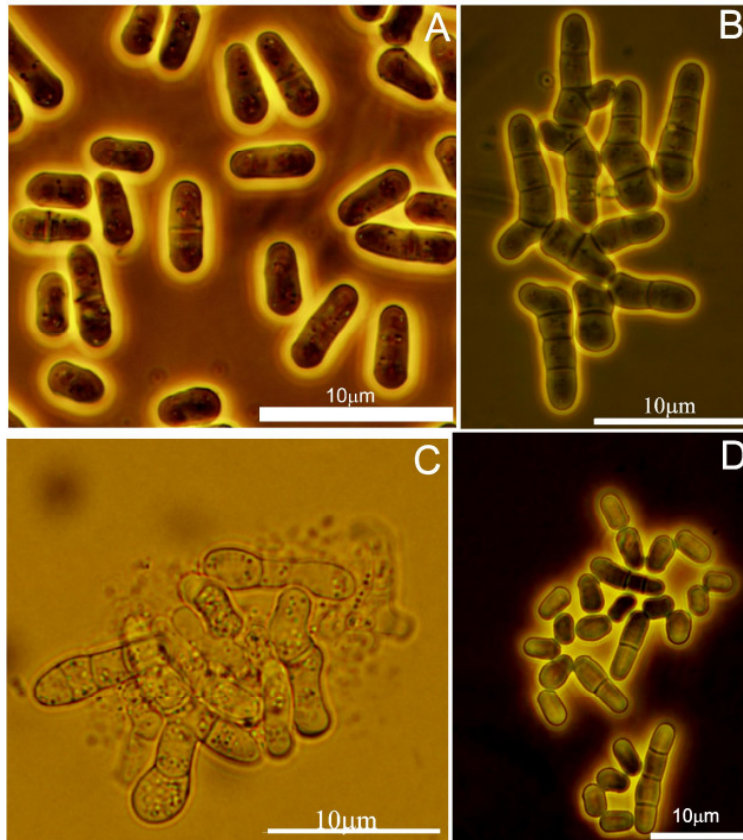
A (A) vad típusú (0-1); (B) pREP1 plazmiddal transzformált (94-es transzformáns) (C) pREP1-*sep1<sup>Sj</sup>* plazmiddal transzformált (92-es transzformáns) és (D) pREP81-*sep1<sup>Sj</sup>* plazmiddal transzformált (90-es transzformáns) *sep1* mutáns sejtek mikroszkópi morfológiája (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).

#### 4.4.2.2. Az *ace2<sup>Sj</sup>* komplementáló hatásának vizsgálata

Az 5-6 nap múlva megjelenő transzformánsokat és a vad típusú *Sch. pombe* (0-1) és *ace2Δ Sch. pombe* (2-1043) törzseket szilárd EMMA táptalajon tenyésztettük a 3.7.3. fejezetben leírt módszer segítségével 30 °C-on egy éjszakán át. Majd másnap megvizsgáltuk a sejtek morfológiáját. Az **53. ábrán** látható a vad típusú (0-1) és a *Sch. pombe ace2Δ* (2-1043) sejtek közötti morfológiai különbség. A vad típusú (0-1) sejtek hengeresek, nem tartalmaznak szeptumot, vagy az éppen osztódásban lévők rendelkeznek eggyel (**53/A. ábra**). A *Sch. pombe ace2Δ* (2-1043) sejtek ezzel szemben több szeptumos, elágazó, hifás fenotípust mutatnak (**53/B. ábra**). Az üres pREP42 plazmival transzformált *Sch. pombe ace2Δ* sejtek (70-es transzformáns) nem különböznek morfológiailag az *ace2Δ* mutánstól (nincs ábra).

A pREP2-, 42-, 82-*ace2<sup>Sj</sup>* vektorról kifejeződő *Sch. japonicus* Ace2p<sup>Sj</sup> fehérje morfológiai változásokat okoz a transzformált *Sch. pombe*-ben. A legerősebb fehérje expressziót lehetővé tevő pREP2-*ace2<sup>Sj</sup>* által transzformált sejtek (71-es transzformáns) életképtelenek. A mikroszkópikus képeken látható, hogy felfúvódnak, lizálnak (**53/C. ábra**). A felfúvódott morfológiát a *Sch. pombe* saját Ace2p fehérje túlermelésekor is leírták [Petit és mtsai, 2005]. Ezt a fenotípust valószínűleg az Ace2p által szabályozott Mid2p, Agn1p, Eng1p célfehérjék túlermelése eredményezi [Petit és mtsai, 2005].

A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* közepes és alacsony szintű termeltetése révén a pREP42 és pREP82-es vektorokkal (72-es és 73-as transzformáns) az *Sch. pombe*-ben mérséklődik az *ace2* mutációra jellemző fenotípus. A normál, szeptum nélküli, és osztódó egy szeptumos sejtek száma magasabb, míg a két és többszeptumos sejteké alacsonyabb a mutánshoz viszonyítva (**53/D. ábra**). Ez a különféle sejtek (nem szeptumos, egy szeptumos sejt pár, két vagy több szeptumos sejt lánc) számolásával is bizonyítható. Ezt a sejt számolást a 3.9.3. fejezet alapján végeztük. A **54. ábrán** látható, hogy az *ace2Δ* és az üres pREP42 vektorral transzformált *Sch. pombe* sejtekben a két vagy több szeptummal rendelkező sejt láncok aránya nagy a vad típushoz viszonyítva. A *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génjét tartalmazó pREP42-*ace2<sup>Sj</sup>* (72-es transzformáns) és pREP82-*ace2<sup>Sj</sup>* (73-as transzformáns) vektorokkal transzformált *Sch. pombe* sejtek között pedig ezeknek a többszeptumos sejt láncoknak a száma csökken, bár nem akkora mértékűre mint a vad típusban lévő számuk.

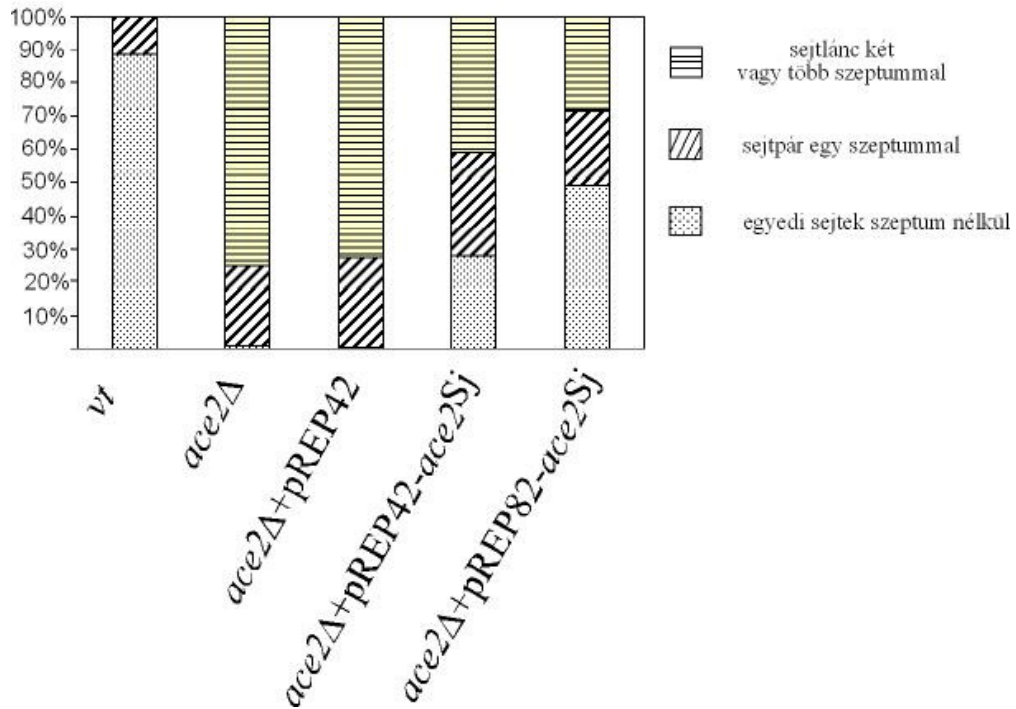


53. ábra

**A *Sch. pombe ace2Δ* mutáns fenotípusának komplementálása *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génnel.**

A (A) vad típusú (0-1); (B) *ace2Δ* (2-1043) (C) *ace2Δ* + pREP2-*ace2<sup>Sj</sup>* (71-es transzformáns) sejtek és (D) *ace2Δ Sch. pombe*+ pREP82-*ace2<sup>Sj</sup>* sejtek (73-as transzformáns) mikroszkópi morfológiája (fény-, és fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).

A komplementációt Dekker és mtsai (2004) által leírt szedimentációs módszerrel (3.9.2. fejezet) is megvizsgáltuk. A vad típusban (0-1), az *ace2Δ* (2–1043) mutánsban és a transzformánsokban mértük azt az időtartamot, mely alatt az eredeti OD<sub>590</sub>-en mért abszorbanciájuk 80% illetve 50%-ára csökken. Ugyanis a sejtláncokat tartalmazó tenyészetek hamarabb ülepednek, így az OD<sub>590</sub>-en mért abszorbanciájuk is gyorsabban csökken.

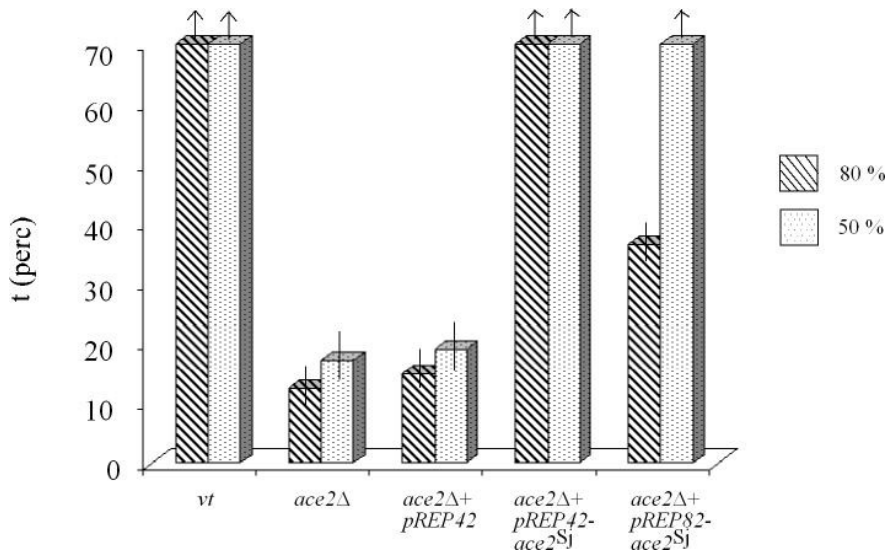


**54. ábra**

Az egyedi sejtek, egy szeptummal rendelkező sejtpárok, és a két vagy több szeptumos sejtláncok aránya a vad típusú (0-1), *ace2Δ* (2–1043), illetve az üres pREP42 (70-es transzformáns), *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génjét tartalmazó pREP42-*ace2<sup>Sj</sup>* (72-es transzformáns) és pREP82-*ace2<sup>Sj</sup>* (73-as transzformáns) vektorokkal transzformált *Sch. pombe* sejttenyészetekben.

A **55. ábrán** látható, hogy az *ace2Δ Sch. pombe* (2–1043) és az üres pREP42 plazmiddal transzformált sejtek (70-es transzformáns) gyorsan ülepednek a vad típusúhoz (0-1) képest, míg a *Sch. japonicus ace2<sup>Sj</sup>* génjét tartalmazó pREP42-*ace2<sup>Sj</sup>* (72-es transzformáns) és pREP82-*ace2<sup>Sj</sup>* (73-as transzformáns) vektorokkal transzformált *Sch. pombe* sejttenyészetek abszorbanciája lassabban csökken a mutánséhoz képest, ami azt jelzi, hogy kevesebb a sejtlánc, és nagyobb az egyedi sejtek aránya.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a *Sch. japonicus Ace2p<sup>Sj</sup>* képes részlegesen komplementálni a *Sch. pombe ace2Δ* mutáns fenotípusát.



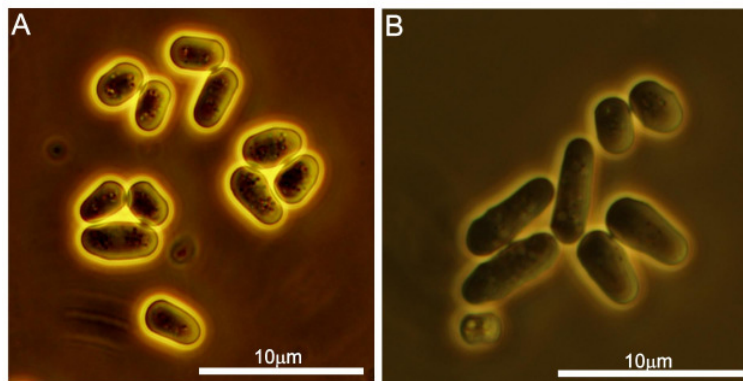
**55. ábra**

A *Sch. pombe ace2Δ* komplementáció vizsgálata szedimentációs módszerrel.

A vad típusú (0-1) az *ace2Δ* (2-1043) és pREP42 (70-es transzformáns), pREP42-*ace2<sup>Sj</sup>* (72-es transzformáns), pREP82-*ace2<sup>Sj</sup>* (73-as transzformáns) plazmidokkal transzformált *ace2Δ* *Sch. pombe* sejtek abszorbanciájának csökkenési ideje. (a nyilak azt jelzik, hogy a grafikonon feltűnhető értékektől is több idő alatt csökken le az abszorbancia).

#### 4.4.2.3. Az *agn1<sup>Sj</sup>* komplementáló hatásának vizsgálata

A transzformánsokat megvizsgáltuk fáziskontraszt mikroszkópiával (3.7.3. fejezet), és összehasonlítottuk morfológiailag a vad típusú és *Sch. pombe agn1Δ* törzsekkel (2-1402). A vad típusú (0-1) és a *Sch. pombe agn1Δ* (2-1402) közötti morfológia különbség rendkívül kicsi (**39/A. és 41/A. ábrák**). Mivel az Agn1p fehérje az osztódó sejtek közötti sejtfal elbontásáért felelős, génjének mutációjával a sejtek nehezen bontják el a sejtfalat, ezért nem válnak el tökéletesen. A sejtek egy része elválik, mások párokban maradnak [Dekker és mtsai, 2004; Garcia és mtsai, 2005]. A mutáns fenotípus nem annyira szembetűnő, mint a *sep1<sup>+</sup>* és *ace2<sup>+</sup>* gének mutációja esetében, amelyek hosszú sejtláncokat képeznek. A vadhoz viszonyított kis morfológiai különbség miatt a *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* génjének komplementáló hatását nehéz bizonyítani.

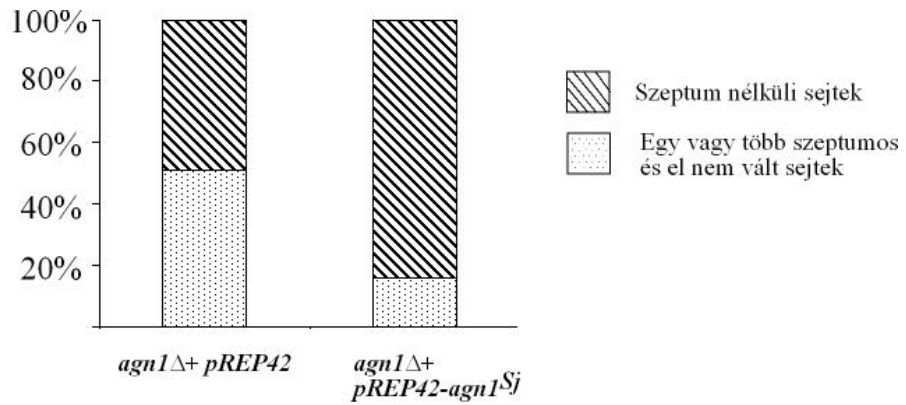


**56. ábra**

**A *Sch. pombe agn1Δ* fenotípusának komplementálása *agn1<sup>Sj</sup>*-vel.**

(A) *Sch. pombe agn1Δ* sejtek (2-1402) (B) *Sch. pombe agn1Δ* + pREP42-*agn1<sup>Sj</sup>* sejtek (84-es transzformáns) (fáziskontraszt mikroszkópi felvételek).

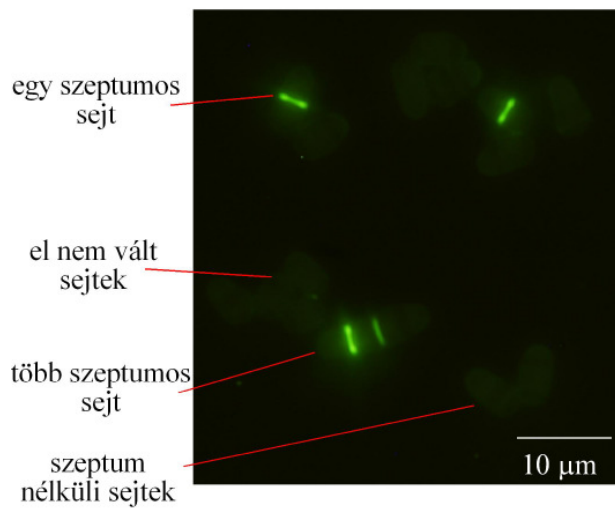
Az **56. ábrán** látható, hogy morfológiailag nehéz megállapítani a komplementáció meglétét. Számszerűsítettük, hogy az üres plazmiddal és a *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* génjét tartalmazó pREP2,42,82 vektorokkal transzformált sejtek között mennyi a párokban álló illetve az egyedi sejtek aránya. Calcofluor festéssel (3.7.2. fejezet) láthatóvá tettük, hogy melyek azok a sejtek, amelyek valóban kapcsolatban vannak a szeptum révén, vagy csak egymás mellé sodródtak. A statisztikát (**57. ábra**) az **58. ábrán** jelölt sejtípusok számolásával készítettük az üres pREP42 vektorral illetve a *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* génjét tartalmazó *Sch. pombe* sejtekből (84-es transzformáns). Az **57. ábrán** látható, hogy a *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* gén hatására csökken a szeptummal rendelkező, illetve szét nem vált sejtek aránya, tehát a *Sch. japonicus* Agn1p fehérje képes részlegesen komplementálni a *Sch. pombe agn1Δ* mutáns fenotípusát.



**57. ábra**

A *Sch. pombe agn1Δ* komplementálása *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* génnel

A bal oldali diagram az üres vektorral transzformált (81-es transzformáns), míg a jobb oldali a *Sch. japonicus* gént tartalmazó pREP 42 vektorral transzformált sejtek (84-es transzformáns) között mutatja a szeptum nélküli illetve az egy és több szeptummal rendelkező sejtek arányát. A statisztika calcofluorral festett sejtek számolásával történt.

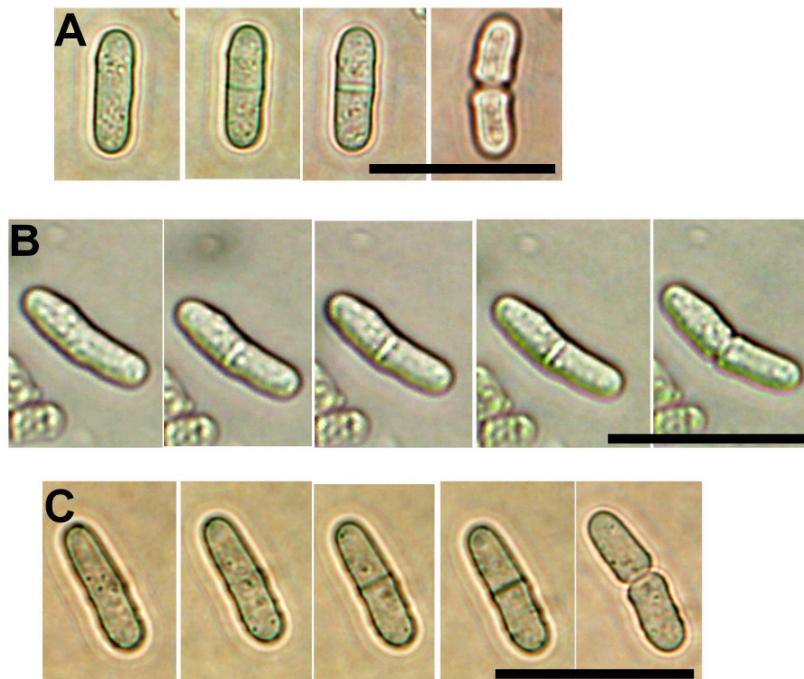


**58. ábra**

A *Sch. pombe agn1Δ* sejtek mikroszkópi morfológiája (calcofluorral festett sejtek mikroszkópi megjelenése).

#### 4.4.2.4. Az *eng1<sup>Sj</sup>* komplementáló hatásának vizsgálata

Az *eng1Δ* + pREP42-*eng1<sup>Sj</sup>* (98) transzformánsokat megvizsgáltuk fáziskontraszt mikroszkópiával (3.7.3. fejezet), és összehasonlítottuk morfológiailag a vad típusú és *Sch. pombe eng1Δ* törzsekkel (2-1401). A vad típusú (0-1) és a *Sch. pombe eng1Δ* (2-1401) közötti morfológia különbség kis mértékű (39/A és 40/A. ábrák). Az Eng1p fehérje az osztódó sejtek közötti elsődleges szeptum elbontásáért felelős, ezért a sejtek lassabban válnak el egymástól [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003]. Az elsődleges szeptum calcofluorral jól festődik, ezért osztódáskor nyomon követhető annak megléte, illetve feloldása. Sipiczki és Bozsik (2000) azt tapasztalták, hogy az elsődleges szeptum feloldása spontán is megtörténik mechanikailag összetöredezett *sep1<sup>-</sup>* törzsekben. Tehát az Eng1p nem esszenciális a sejtosztódáskor, ezért komplementáló hatását nehéz vizsgálni.



59. ábra

**Az *eng1<sup>Sj</sup>* komplementáló hatásának vizsgálata összehasonlító „time-lapse” vizsgálattal.**

(A) vad típusú (0-1) (B) *eng1Δ* (2-1401) (C) *eng1Δ* + pREP42-*eng1<sup>Sj</sup>* (98-os transzformáns)

*Sch. pombe* sejtek time lapse analízise. Az 'A' és 'C' mikroszkópi fényképsorozat 10 míg a

'B' 20 percenként készült fénymikroszkópi vizsgálat során. A mérték 10  $\mu$ m-es.

A különbséget a sejtosztódási ciklus hosszában, a szeptumfeloldás sebességében találtuk mikroszkópikus time-lapse vizsgálattal. Mértük azt az időtartamot ami a szeptum megjelenése és az elsődleges szeptum elbontásának kezdete között telt el (ekkor a sejtek még kapcsolatban vannak egymással, a szeptum két oldalán „befűződés” keletkezik). A vad típusú *Sch. pombe* (0-1) sejt átlagosan 20 perc alatt jut el a szeptumfeloldásig (**59/A ábrarozat**). A *Sch. pombe eng1Δ* sokkal lassabban, 40-60 perc alatt jut el a „befűződés” állapotig (**59/B ábrarozat**). *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>* génnel transzformált *Sch. pombe* törzs (96-os transzformáns) a vad típusnál lassabban, a mutánsnál viszont gyorsabban: átlagosan 30 perc alatt jut el a szeptum megjelenésétől a kezdeti feloldás időpontjáiig (**59/C ábrarozat**).

Ha azt feltételezzük, hogy a különféle típusú sejtek szeptumfeloldási sebességei normális eloszlást követnek, két mintás egyfarkú t-próbával meghatározható, hogy a mutáns és transzformánsok között szignifikáns különbség van-e a szeptumfeloldásban. Ha azonos szórást feltételezünk a két adatsorban (mutáns és transzformáns), akkor a szeptumfeloldási sebesség várható értéke a két csoportban szignifikáns különbséget mutat, markáns,  $p = 1,35 \times 10^{-5}$  szignifikanciaszint mellett. A különbség a két csoport varianciájának egyenlőségére tett előfeltételünket elhagyva is szignifikáns ( $p=0,0016$ ), tehát a transzformáns szeptumfeloldási sebessége ténylegesen gyorsabb, mint az *eng1<sup>-</sup>* mutánsé. Mindezt típusonként 10-15 sejt (egy „látómezőbe” eső) mikroszkópos time-lapse analízisével készített fotóiból állapítottuk meg.

Ez alapján feltételezhető, hogy a *Sch. japonicus Eng1p* fehérje képes részlegesen komplementálni a *Sch. pombe eng1Δ* fenotípusát.

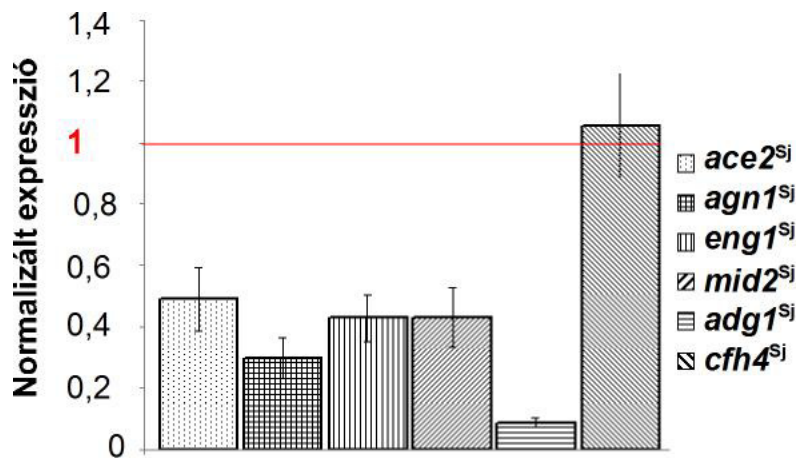
#### **4.5. A *Sch. japonicus* gének funkció-vizsgálata *Sch. japonicus*-ban**

##### **4.5.1. A *sep1<sup>Sj</sup>* inaktíválásának hatása más sejtszeparációs gének működésére**

A vad típusú (7-1) és a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* *Sch. japonicus* (7-254) törzsből RNS-t izoláltunk a 3.5.9. fejezet leírása alapján, majd a cDNS-é való átírása után (3.5.11. fejezet) kvantitatív real time PCR-rel (3.5.12. fejezet) megvizsgáltuk azoknak a *Sch. japonicus* géneknek az mRNS szintjét, amelyek homológjai a *Sch. pombe*-ben a Sep1p transzkripció faktor pozitív szabályozása alatt állnak [Alonso-Nuñez és mtsai, 2005]. A **60. ábrán** látható, hogy a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* mutáns (7-254) *Sch. japonicus*-ban az *ace2<sup>Sj</sup>*, *eng1<sup>Sj</sup>*, *mid2<sup>Sj</sup>* gének

mRNS szintje körülbelül fele, az *agn1<sup>Sj</sup>* géné a harmada, az *adg1<sup>Sj</sup>* géné pedig a tizede a vad típus (7-1) relatív 1-nek vett mRNS szintjeihez képest.

Ez alapján valószínűsíthető, hogy ezek a gének közvetlenül vagy közvetve a *Sch. japonicus*-ban is a Sep1p transzkripció faktor pozitív kontrollja alatt állnak. Nem csökken a gének expressziója nullára, tehát a Sep1p hiányában is megtörténik kis mértékű transzkripciójuk. A *cfh4<sup>Sj</sup>* gén mRNS szintje nem kisebb a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* mutánsban a vad típus mRNS szintjéhez képest, tehát valószínűleg a *Sch. japonicus*-ban a Sep1p<sup>Sj</sup> nem befolyásolja ennek a génnek a szabályozását, nem úgy, mint a *Sch. pombe*-ben [Alonso-Núñez és mtsai, 2005]. A *cfh4<sup>Sj</sup>* szerepét még nem vizsgálták *Sch japonicus*-ban. A rokonfaj *Sch. pombe cfh4* génje (SPBC3E7.12c) a *Saccharomyces cerevisiae CHS4* génjével homológ [Alonso-Núñez és mtsai, 2005], ami a kitin-szintáz III fehérje regulátor alegységét kódolja [Trilla és mtsai, 1997]. A *cfh4* gén szerepe kérdéses még a *Sch. pombe*-ben is, ugyanis többen is leírták [pl.: Houwink és mtsai, 1953; Bush és mtsai, 1974], hogy a sejtfa nem tartalmaz számottevő mértékben kitint.



60. ábra

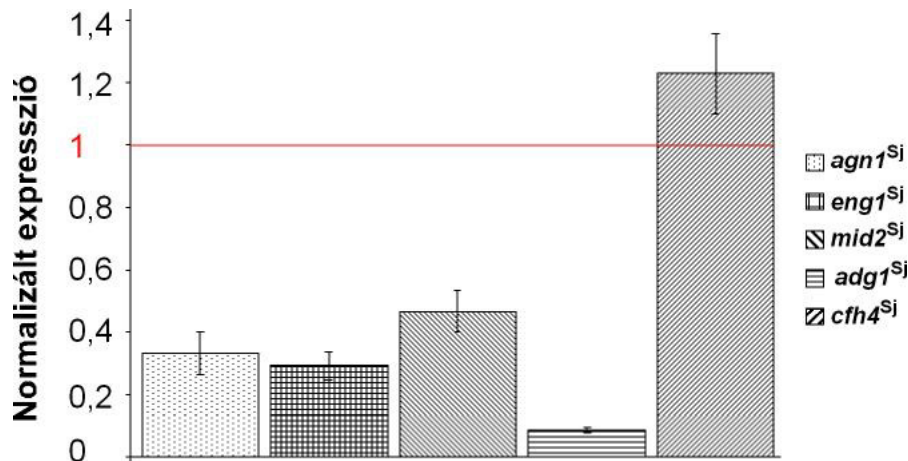
A sejtszeparációban résztvevő gének mRNS szintjének meghatározása a *sep1<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-254) *Sch. japonicus*-ban a vad típusú (7-1) törzs mRNS szintjéhez (1-nek tekintett relatív érték pirossal jelölve) viszonyítva qPCR-rel.

#### 4.5.2. Az *ace2<sup>Sj</sup>* inaktiválásának hatása más sejtszeparációs gének működésére

A vad típusú (7-1) és az *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* *Sch. japonicus* (7-258) törzsből RNS-t izoláltunk a 3.5.9. fejezet leírása alapján, majd a cDNS-é való átírása után (3.5.11. fejezet)

kvantitatív real time PCR-rel (3.5.12. fejezet) megvizsgáltuk azoknak a *Sch. japonicus* géneknek az mRNS szintjét, amelyek homológjai az *Sch. pombe*-ben a Sep1p transzkripciósfaktor pozitív szabályozása alatt állnak [Alonso-Nuñez és mtsai, 2005]. A **61. ábrán** látható, hogy az *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* mutáns (7-258) *Sch. japonicus*-ban az *mid2<sup>Sj</sup>* gén mRNS szintje körülbelül a fele, az *agn1<sup>Sj</sup>* és *eng1<sup>Sj</sup>* géneké körülbelül a harmada, az *adg1<sup>Sj</sup>* géné pedig a tizede a vad típus (7-1) 1-nek vett relatív mRNS szintjeihez képest.

Ez alapján valószínűsíthető, hogy ezek a gének közvetlenül vagy közvetve a *Sch. japonicus*-ban is az Ace2p transzkripciósfaktor kontrollja alatt állnak. Mivel nem csökken le nullára a génekről átíródó mRNS-ek szintje az Ace2p hiányában, azok valószínűleg Ace2p nélkül is kis mértékben kifejeződnek. A *cfh4<sup>Sj</sup>* gén mRNS szintje nem kisebb az *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* mutánsban sem a vad típus mRNS szintjéhez képest, tehát valószínűleg a *Sch. japonicus*-ban az Ace2p nem hat ennek a génnek a szabályozására, nem úgy, mint a *Sch. pombe*-ben [Alonso-Nuñez és mtsai, 2005].



**61. ábra**

A sejtszeparációban résztvevő gének mRNS szintjének meghatározása az *ace2<sup>Sj</sup>::ura4<sup>+</sup>* (7-258) *Sch. japonicus*-ban a vad típusú (7-1) törzs mRNS szintjéhez (1-nek tekintett relatív érték piros vonallal jelölve) viszonyítva qPCR-rel.

### 4.5.3. Az *agn1<sup>Sj</sup>* gén termékének sejten belüli lokalizációja

#### 4.5.3.1. Konstrukció létrehozása GFP-vel jelölt *Agn1p<sup>Sj</sup>* fehérje képzésére

Az *agn1<sup>Sj</sup>* gén kromoszomális GFP jelölését végeztük el a *Sch. japonicus* –ban, a gén C-terminális végén. A pFA6a-kanMX6-GFP plazmidot (2. ábra) használtuk a PCR reakcióhoz az *agn1GFPfor* és *agn1japDrev* primerekkel (3. táblázat, 34. ábrán lilával és rózsaszínnel jelölve). A forward primer eleje 80 bp-t tartalmaznak az *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* gén végéből a stop kodon nélkül, a vége pedig a pP6kanMX6 GFP plazmiddal komplementer (34. ábra). A reverse primer megegyezik az *agn1<sup>Sj</sup>* géndeléciónál használt reverse primerrel (34. ábra) [Bähler és mtsai, 1998]. A PCR reakcióhoz (3.5.2. fejezet) High Fidelity DNA polimerase enzimet használtunk (Finnzyme) alapján és templátként a pFA6a-GFP-kanMX6 plazmidot használtuk. A hőmérsékleti kondíciók a következők voltak: 1. lépés: 98 °C, 3 perc; 2. lépés: 98 °C, 10 másodperc; 3. lépés: 55 °C, 20 másodperc; 4. lépés: 72 °C, 1,5 perc; 5. lépés: 2-4 lépés 30-szor ismételve; 6. lépés: 72 °C, 10 perc; 7. lépés: 4 °C ∞. A kapott PCR terméket GFX oszlopon tisztítottuk a kit utasításai alapján (GE Healthcare), majd töményítettük vákuumcentrifugálással (3.9.1. fejezet) a megfelelő DNS koncentráció eléréséhez. A transzformációhoz a *Sch. japonicus ura4<sup>-</sup>* (7-252) törzset használtuk. A transzformálás elektroporátoros módszerrel történt a 3.5.6. fejezet alapján. A sejteket YEA táptalajra szélesztettük, majd egy nap múlva átreplikáztuk YEA+100 és 200 mg/ml geneticin tartalmú szilárd táptalajra és a Petri csészéket 30 °C fokon inkubáltuk 5-7 napig, hogy a geneticin rezisztens transzformánsokat azonosíthassunk.

#### 4.5.3.2. Az *Agn1p<sup>Sj</sup>*-GFP sejten belüli lokalizációja fluoreszcens mikroszkópiával

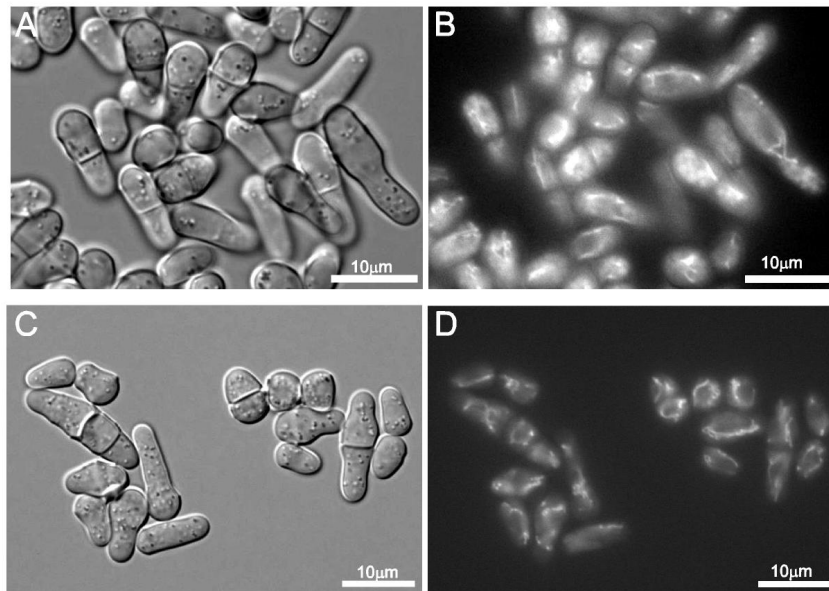
A transzformánsokat EMMML folyékony tápoldatban tenyésztettük 200 rpm mellett 25 fokon egy éjszakán át. Illetve 200 µl EMMML tápoldatban szuszpendáltunk egy kevés sejtet és EMMA szilárd táptalajra szélesztettük őket, és növesztettünk 25 °C-on egy éjszakán át. Ebben az esetben a sejtek egy rétegben nőnek, ami megkönnyíti a mikroszkópi vizsgálatukat. A mikroszkópi vizsgálatok Nikon Eclipse 90i mikroszkóppal GFP szűrővel történtek 60X objektívvel. A kromoszomális *agn1<sup>Sj</sup>*-GFP jelölés során kapott *Sch. japonicus* (7-261) törzs mikroszkópi vizsgálataival (62/C és D. ábra) megállapítottuk, hogy keletkezik fluoreszcens protein, a jelölés során és, hogy annak lokalizációja nem a sejtfal közelében volt, ahol vártuk, hanem látszólag az endoplazmás retikulumban. Valószínűleg a GFP-toldalék olyan

térszerkezeti változásokat hoz létre, amelyek zavart okozhatnak a fehérje sejten belüli transzportjában (pl. nem tudja elhagyni az ER-t).

#### 4.5.4. Az *eng1<sup>Sj</sup>* gén termékének sejten belüli lokalizációja

##### 4.5.4.1. Konstrukció létrehozása GFP-vel jelölt Eng1p<sup>Sj</sup> fehérje képzésére

Az *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>* gént *Bam*HI restrikciós enzimmel kivágtuk (3.5.4. fejezet) a pUC18-*eng1<sup>Sj</sup>* -ből és ligáltuk a pREP42-EGFP C vektorba (3.5.5. fejezet). Ebben a plazmidban az Eng1p<sup>Sj</sup> fehérje C-terminális végéhez kapcsoljuk hozzá a GFP-toldalékot. A pREP42-EGFP C-*eng1<sup>Sj</sup>* vektorral transzformáltuk az *ura4<sup>-</sup>* *Sch. japonicus* törzset (7-252) elektroporátoros módszerrel (3.5.6. fejezet). A sejteket EMMA táptalajra szélesztettük, melyen csak azok képeztek telepeket, melyek felvették a plazmidot. A plazmidon lévő *ura4<sup>+</sup>* gén ugyanis komplementálja a transzformált auxotróf törzs *ura4<sup>-</sup>* mutációját.



62. ábra

**Az Agn1<sup>Sj</sup>-GFP és Eng1<sup>Sj</sup>-GFP lokalizációja *Sch. japonicus* sejtekben.**

Az (A, B) *ura4<sup>-</sup>* *Sch. japonicus* (7-252) +pREP42 EGFP C-*eng1* illetve (C, D)  $\alpha\zeta$   $\Delta$ *ura4 agn1<sup>Sj</sup>*- GFP kanMX6 *Sch. japonicus* (7-261) sejtek mikroszkópi morfológiája (A és C: a sejtek DIC morfológiája, B és D: a sejtek fluoreszcens mikroszkópi megjelenése).

#### 4.5.4.2. Az Eng1p<sup>Sj</sup>-GFP sejten belüli lokalizációja fluoreszcens mikroszkópiával

A mikroszkópi vizsgálatok a *Sch. japonicus* *ura4 agn1<sup>Sj</sup>*-GFP-kanMX6 (7-261)-éhoz hasonlóan történtek, ami a 4.5.3.2. fejezetben került leírásra. A *Sch. japonicus* *ura4Δ* (7-252) pREP42 EGFP *C-eng1<sup>Sj</sup>* vektorral történt transzformálás után a GFP fehérje látható volt fluoreszcens mikroszkópban, de az úgy tűnik, hogy nem tudja kifejteni funkcióját, mert megrekedt az endoplazmás retikulumban (**62. A és B ábrák**). A *Sch. pombe*-ben szállító vakuólumok juttatják el az Eng1p-t a sejtfalhoz, ahol az osztódó sejtek közötti elsődleges szeptum lebontásáért felelős [Martin-Cuadrado és mtsai, 2003], a *Sch. japonicus*-ban is hasonló eredményt vártunk, de nem ezt kaptuk (sikertelen kísérlet feltételezett okát lásd 4.5.3.2. fejezetben), ezért új GFP konstrukció tervezése és létrehozása szükséges. Mivel az expressziót pREP42-EGFP-C plazmiddal végeztük, az eredményünk azt is jelzi, hogy a pREP thiamine represszálható vektor működik az *Sch. japonicus*-ban is.

#### 4.5.5. A *mid2<sup>Sj</sup>* gén termékének sejten belüli lokalizációja

##### 4.5.5.1. Konstrukció létrehozása GFP-vel jelölt Mid2p<sup>Sj</sup> fehérje képzésére

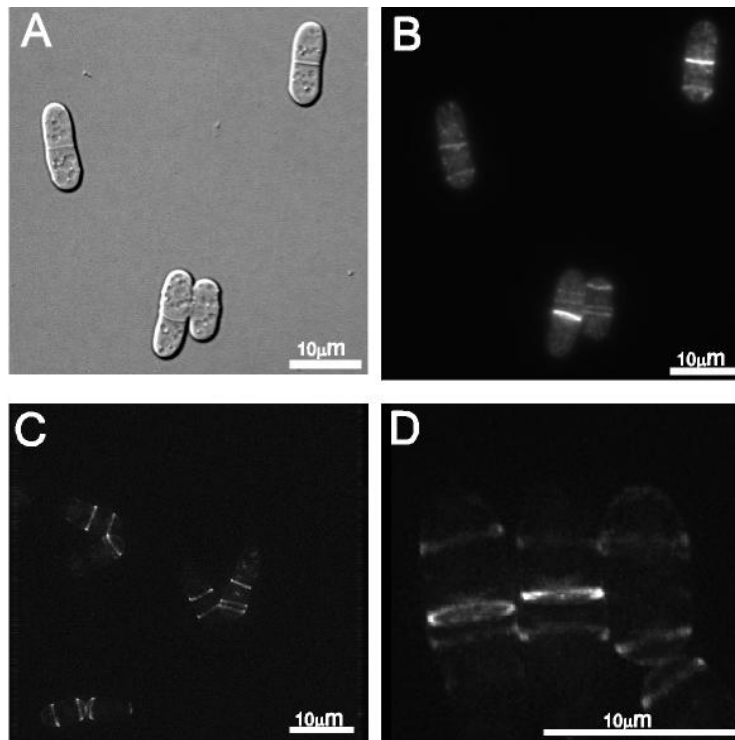
A *mid2<sup>Sj</sup>* gén kromoszómális GFP jelölése történt az *Sch. japonicus*-ban, a gén C-terminális végén. Ehhez a pFA6a-GFP-kanMX6 (**15. ábra**) plazmiddal végeztük a PCR reakciót *mid2GFP<sub>for</sub>* és *mid2GFP<sub>rev</sub>* primerekkel (**3. táblázat**), amelyek a **36. ábrán** sötétlilával láthatóak. A forward primer eleje 80 bp-t tartalmaz a *Sch. japonicus* *mid2<sup>Sj</sup>* gén végéből a stop kodon nélkül, a vége pedig a pFA6a-GFP-kanMX6 plazmiddal komplementer. A reverse primer 80 bp-t tartalmaz a *mid2<sup>Sj</sup>* gén terminátor régiójából kb. 50 bp-nyira a stop kodontól, a primer vége pedig szintén a pFA6a-GFP-kanMX6 plazmiddal komplementer (**36. ábra**) [Bähler és mtsai, 1998]. A PCR reakcióhoz (3.5.2. fejezet) High Fidelity DNA polimeráz enzimet használtunk (Finnzyme), templátként pedig a FA6a-kanMX6-GFP plazmidot. A hőmérsékleti kondíciók a következők voltak: 1. lépés: 98 °C, 3 perc; 2. lépés: 98 °C, 10 másodperc; 3. lépés: 55 °C, 20 másodperc; 4. lépés: 72 °C, 1,5 perc; 5. lépés: 2-4 lépés 30-szor ismételve; 6. lépés: 72 °C, 10 perc; 7. lépés: 4 °C, ∞. A kapott PCR terméket GFX oszlopon (GE Healthcare) tisztítottuk, majd töményítettük vákuumcentrifugálással (3.9.1. fejezet) a megfelelő DNS koncentráció eléréséhez. A *ura4<sup>-</sup>* *Sch. japonicus* (7-252) törzs transzformálása elektroporátoros módszerrel történt a 3.5.6. fejezet leírása alapján. A sejteket YEA táptalajra szélesztettük, majd 1 napos 30 °C-on történő inkubálás után átreplicáztuk YEA+100 és 200 mg/ml geneticin tartalmú szilárd

táptalajra és a csészéket 30 °C fokon tovább inkubáltuk 5-7 napig, hogy a transzformánsokat azonosíthassuk.

#### 4.5.5.2. A Mid2p<sup>Sj</sup>-GFP sejtben belüli lokalizációja fluoreszcens mikroszkópiával

Az *ura4<sup>Sj</sup>Δ mid2<sup>Sj</sup>-GFP-kanMX6 Sch. japonicus* sejtek mikroszkópi vizsgálata a 4.5.3.2. fejezetben már leírásra került módszerrel történt. A Mid2p<sup>Sj</sup> gyűrűről készült fluoreszcens 3D képek Personal Delta Vision mikroszkóppal készültek. A mikroszkópius képeken jól látható a Mid2p protein gyűrű, néhol korong (63. ábra).

Tehát a Mid2p-nek hasonló szerepe lehet az *Sch. japonicus* élesztő formájában, mint az *Sch. pombe*-ben, ahol a szeptinokkal együtt alkot egy gyűrűt, amely segíti az Eng1p<sup>Sj</sup> és Agn1p<sup>Sj</sup> enzimek megfelelő lokalizációját, ahhoz, hogy feladatukat elláthassák [Martin-Cuadrado és mtsai, 2005].



63. ábra

#### A Mid2<sup>Sj</sup>-GFP lokalizációja *Sch. japonicus* sejtekben.

A *Sch. japonicus ura4<sup>Sj</sup>Δ mid2<sup>Sj</sup>-GFP-kanMX6* sejtek (7-257) mikroszkópi morfológiája (A) a sejtek DIC morfológiája, (B-D): a sejtek fluoreszcens mikroszkópi megjelenése.

## 5. Összefoglalás

Munkánk során a következő eredményeket értük el:

1. A dimorf *Sch. japonicus* feltételezhetően sejtszeparációban résztvevő génjeit (*sep1<sup>Sj</sup>*, *ace2<sup>Sj</sup>*, *eng1<sup>Sj</sup>*, *agn1<sup>Sj</sup>*, *mid2<sup>Sj</sup>*) inaktiváltuk és megvizsgáltuk a mutánsok fenotípusait, amelyek hasonlóan bizonyultak a homológ génekben mutáns *Sch. pombe*-éhoz. A *sep1<sup>Sj</sup>*, *ace2<sup>Sj</sup>*, *agn1<sup>Sj</sup>* mutánsok egyértelműen fonalas morfológiát mutattak az élesztőfázisban. Az *eng1<sup>Sj</sup>* és *mid2<sup>Sj</sup>* mutációk hatása a sejtszeparációra ugyanúgy kevésbé szembetűnő mint a *Sch. pombe* esetében, mivel a sejtláncképzés kisebb mértékű. A fenotípusos hasonlóság alapján valószínűsítjük, hogy a *Sch. japonicus*-ban is hasonló feladatot láthatnak el ezek a gének, mint a *Sch. pombe*-ben, ahol a szerepük a sejtszeparációban egyértelműen bizonyított a mutánsok mérsékelt defektusai ellenére is. Az *agn1<sup>Sj</sup>* génnek feltehetőleg nagyobb szerepe a *Sch. japonicus*-ban, mint rokonfajában, ugyanis a létrejött mutáns fenotípus a szabályozógének (*sep1<sup>Sj</sup>*, *ace2<sup>Sj</sup>*) mutáns megjelenéséhez hasonló.
2. A sejtszeparációs *Sch. japonicus* mutánsoknak megvizsgáltuk a hifaképzését és hifadarabolódását, s eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy ezek a gének valószínűleg nem játszanak szerepet a micéliális növekedésben, de részt vesznek a micélium fázisból az élesztőfázisra történő átlépésben. Mind az öt vizsgált mutánsban eltérő módon lépnek vissza a sejtek a vad típusú törzshöz képest az unipoláris fonalas növekedésből az élesztőre jellemző bipoláris növekedésre a szeptum feloldási nehézségeik miatt. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy ezek a gének részt vesznek közvetlenül vagy közvetve a *Sch. japonicus* hifa-élesztő átalakulásának szabályozásában.
3. A pREP expressziós vektorsorozat segítségével megvalósítottuk a *sep1<sup>Sj</sup>*, *ace2<sup>Sj</sup>*, *agn1<sup>Sj</sup>*, *eng1<sup>Sj</sup>* gének expresszióját a *Sch. pombe*-ben, s megvizsgáltuk, hogy a géntermékek képesek-e a homológ génekben mutáns fenotípust komplementálni. Mind a négy gén esetében azt tapasztaltuk, hogy részlegesen képesek komplementálni a rokonfaj *Sch. pombe* mutáns fenotípusát. Ez alapján megállapítható, hogy a szekvenciális hasonlóság a két faj sejtszeparációs génjei között lehetővé teszi a funkcionális felcserélhetőséget is.
4. Kvantitatív PCR vizsgálatokkal megvizsgáltuk, hogy a két szabályozógénben (*sep1<sup>Sj</sup>*, *ace2<sup>Sj</sup>*) mutáns *Sch. japonicus* törzsekben a feltételezhető célgének mRNS

szintje hogyan változik. Azt tapasztaltuk, hogy a *cfh4<sup>Sj</sup>* gén mRNS-ének kivételével az összes vizsgált gén (*agn1<sup>Sj</sup>*, *eng1<sup>Sj</sup>*, *mid2<sup>Sj</sup>*, *adg1<sup>Sj</sup>*) mRNS szintje lecsökken. Tehát megállapíthatjuk, hogy a *Sch. japonicus*-ban is a Sep1p<sup>Sj</sup> és Ace2p<sup>Sj</sup> fehérjék szabályozzák az *agn1<sup>Sj</sup>*, *eng1<sup>Sj</sup>*, *mid2<sup>Sj</sup>*, *adg1<sup>Sj</sup>* gének transzkripciós szintjét a *Sch. pombe*-hoz hasonlóan. A *cfh4<sup>Sj</sup>* mRNS szintjének szabályozásában pedig valószínűleg nem vesznek részt.

5. Megvizsgáltuk az *eng1<sup>Sj</sup>*, *agn1<sup>Sj</sup>* és *mid2<sup>Sj</sup>* géntermékek sejten belüli lokalizációját GFP fúziós proteinek segítségével. Az Agn1<sup>Sj</sup>-GFP és Eng1<sup>Sj</sup>-GFP sejten belüli elhelyezkedését feltehetően technikai problémák miatt nem tudtuk tisztázni, ugyanis a fluoreszcens proteinek látszólag az endoplazmás retikulumban lokalizálódtak. Valószínű, hogy a GFP toldalék olyan térszerkezeti változásokat hoz létre, amelyek zavart okozhatnak a fehérjék sejten belüli transzportjában (pl. nem tudják elhagyni az ER-t). További kísérletek szükségesek, hogy a működő fehérjék sejten belüli elhelyezkedését vizsgálhassuk.

A Mid2<sup>Sj</sup> -GFP fehérje megfigyelhető volt. Egy gyűrű alakú struktúrát vesz fel a szeptum körüli régióban, ugyanúgy, mint a megfelelője a *Sch. pombe*-ben. Ez megerősíti a feltételezést, hogy a Mid2p<sup>Sj</sup> részt vesz a sejtszeptációban és feltételezhetően hasonló szerepe lehet, mint a *Sch. pombe*-ben, azaz a szeptum körüli régióban a szeptinokkal együtt gyűrűt alkotva segíti az Agn1p<sup>Sj</sup> és Eng1p<sup>Sj</sup> enzimek megfelelő helyre kerülését.

## 6. További tervezett vizsgálatok

- 1 A *Sch. japonicus* Mid2p<sup>Sj</sup> komplementáló hatásának vizsgálata a *Sch. pombe* mid2Δ mutánsban.
- 2 A *Sch. japonicus* Eng1<sup>Sj</sup>-GFP, Agn1<sup>Sj</sup>-GFP fehérjék tényleges lokalizációjának megismerése a kísérleti tényezők optimalizálásával például linker szekvencia beépítése a gén és a GFP szekvencia közé, amely segítheti a fehérje normális érését. Más gombában, például *Saccharomyces cerevisiae*-ben már leírtak hasonlót [Funakoshi és Hochstrasser, 2009]. Később az Eng1<sup>Sj</sup>-GFP, Agn1<sup>Sj</sup>-GFP, és Mid2<sup>Sj</sup>-GFP proteinek lokalizációjának megvizsgálása a *Sch. japonicus* fonalas formájában is. Ilyen kísérleteket más gombáknál sem végeztek még, pedig fontos információt szolgáltathatnak a patogénné válás mechanizmusáról.  
Továbbá tervezzük ezeknek a *Sch. japonicus* fúziós fehérjéknek a rokonfajba, *Sch. pombe*-be való bejuttatását és annak megvizsgálását, hogy ott képesek-e a gazda saját fehérjéihez hasonló gyűrű formát felvenni, illetve komplementálni a gazda mutáns fenotípusát.
3. A különféle sejtszeparációs génekben (*sep1*<sup>Sj</sup>, *ace2*<sup>Sj</sup>, *agn1*<sup>Sj</sup>, *mid2*<sup>Sj</sup>, *eng1*<sup>Sj</sup>) mutáns *Sch. japonicus* törzsek komplementációs vizsgálata a *Sch. pombe* homológ génjeivel.

## 7. Summary

*Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* is a fission yeast, which belongs to the Schizosaccharomycetales order, and its CBS 354 strain was isolated from strawberry wine [Yukawa and Maki, 1931]. It recently became a promising model organism in molecular biology [Rhind et al, 2011] because its genome was completely sequenced (the genome sequence is available in the homepage of Broad Institute). The availability of its genome sequence allows cloning and examining of its genes.

In contrast to *Sch. pombe*, the life cycle of *Sch. japonicus* is dimorphic, which means that it can switch from unicellular yeast-type to hyphal growth after 8-10 days of incubation on solid medium [Sipiczki et al, 1998]. *Sch. japonicus* is not pathogenic, although in some species, for example in *Ustilago maydis* (plant pathogen) [Bölker, 2001], *Candida albicans* and *Histoplasma capsulatum* (human pathogens) the dimorphism is a virulence factor [Eisenberg et al, 1996; Gow & Gooday 1987]. In spite of not being a virulence factor, the investigation of the *Sch. japonicus* dimorphism could help us to understand better the mechanism of virulence of the pathogenic dimorphic fungi, which then may enable medical mycologists to find new anti-fungal therapies.

The final step of the cell cycle in *Sch. pombe* is cytokinesis during which a septum is made at first and then the daughter cells separate by the breakdown of the primary septum (the mature septum has a three layered structure composed of the inner primary septum and the flanking secondary septa)[Johnson et al, 1973]. The genes, the proteins which take part in the cell separation of *Sch. pombe* and their regulation have been examined intensively and are known in details. In this process the proteins are in one signal transduction pathway which has two main transcription factors: Sep1p and Ace2p [Sipiczki et al, 1993; Martin-Cuadrado et al, 2003]. The first described cell-separation gene was *sep1*<sup>+</sup>. It encodes a transcription factor which plays role in other processes as well [Rustici et al, 2004]. The Sep1p protein contains a fork-head-type DNA binding domain and its transcript level shows no periodicity during the cell cycle, so it might be regulated by a post transcriptional mechanism [Zilahi et al, 2000]. The *sep1*Δ cells are unable to separate from each other, and thus show hyphal growth. The *ace2*Δ cells form hyphae indistinguishable from those of *sep1*Δ and the overexpression of *ace2*<sup>+</sup> rescues the *sep1*Δ phenotype [Martin-Cuadrado et al, 2003], indicating that the Sep1p protein controls cell separation through *ace2*<sup>+</sup>. The *ace2*<sup>+</sup> gene encodes a zinc-finger transcription factor [Martin-Cuadrado et al, 2003]. In addition to

Sep1p, two other transcription factors Fkh2p (fork-head protein) and Mbx1p (MADS box protein), have roles in the transcription of *ace2*<sup>+</sup>, most probably by repressing it during interphase [Rustici et al, 2004; Buck et al, 2004; Petit et al, 2005]. Ace2p is posttranslationally modified by phosphorylation and contains 11 partial and one complete cyclin-dependent kinase (CDK) consensus sites, suggesting that Cdc2p might have a role in its regulation [Petit et al, 2005]. Ace2p targets many genes, among others those which encode proteins for septum cleavage (Eng1p, Agn1p) and Mid2p. The latter is an important organiser of the septin ring. The *eng1*<sup>+</sup> gene encodes an endo- $\beta$ -1,3 glucanase which degrades the primary septum. The *agn1*<sup>+</sup> gene encodes an 1,3- $\alpha$ -glucanase which takes part in the erosion of the cell wall around the edge of the primary septum [Martin-Cuadrado et al, 2003; Dekker et al, 2004; Garcia et al, 2005]. Mid2p protein, also regulated by Ace2p, is an anillin homologue, which helps the excitosis of Agn1p and Eng1p by organizing the assembly of the septin ring [Berlin et al, 2003; Tasto et al, 2003].

We identified the genes encoding the homologous proteins of the above mentioned Sep1p, Ace2p, Agn1p, Eng1p, Mid2p in the genome sequence of *Sch. japonicus*. The aim of our research was the characterisation of these genes and proteins. As *Sch. japonicus* is a dimorphic organism, it would also be important to know more about the regulation of the activity of these cell separation genes during the transitions between the yeast to hyphal growth phases.

As a result of our work, the genes, which probably have roles in the cell separation of the *Sch. japonicus* (*sep1*<sup>Sj</sup>, *ace2*<sup>Sj</sup>, *eng1*<sup>Sj</sup>, *agn1*<sup>Sj</sup>, *mid2*<sup>Sj</sup>) were inactivated and the phenotype of the mutants were investigated. The phenotype of the mutant *sep1*<sup>Sj</sup>, *ace2*<sup>Sj</sup> *agn1*<sup>Sj</sup> strains was filamentous in the yeast phase. The effect of the mutations of *eng1*<sup>Sj</sup> and *mid2*<sup>Sj</sup> is as questionable as in the case of the homologue genes of *Sch. pombe*. Based on these data we suppose that these genes have similar roles in the *Sch. japonicus* as their homologues in the *Sch. pombe*: they contribute to the cell separation. The *agn1*<sup>Sj</sup> gene has probably higher effect on cell separation processes in the *Sch. japonicus* than in the *Sch. pombe* cells, because its mutant phenotype is very similar to mutant phenotype of the regulator genes (*sep1*<sup>Sj</sup>, *ace2*<sup>Sj</sup>).

The formation and fragmentation of hypha in *Sch. japonicus* mutant strains were also examined. The mutant phenotypes indicates that these genes have not roles in the mycelial growth, but contribute to the hypha-yeast transition. The mutant hyphae enter the yeast phase in a way different from that observed in the wild type hyphae, because they have

difficulties with the dissolution of their septum. So we think that these genes have roles in the regulation of the hypha-yeast transition in the *Sch. japonicus*.

The *sep1<sup>Sj</sup>*, *ace2<sup>Sj</sup>* *agn1<sup>Sj</sup>* and *eng1<sup>Sj</sup>* expression was examined in the related *Sch. pombe* with constructs integrated into the pREP vector series. The middle and low expression of the *Sch. japonicus sep1<sup>Sj</sup>* and *ace2<sup>Sj</sup>* in the *Sch. pombe sep1<sup>-</sup>* and *ace2<sup>-</sup>* mutants reduced the number of cells with multiple septa, and increased the proportion of single cells. The *Sch. japonicus agn1<sup>Sj</sup>* gene expression in the *Sch. pombe agn1<sup>-</sup>* mutant decreased the number of the cells with septa and the undivided sister cells. Eng1p is not essential during the cell division, so it is difficult to examine the complementation effect of the *Sch. japonicus* gene in *Sch. pombe* mutant cells. The difference between the wild type and *eng1<sup>-</sup>* mutant is in the timing of the dissolution of the primary septum, which was investigated with microscopical time-lapse analysis. The *Sch. pombe eng1<sup>-</sup>* mutant transformed with the *Sch. japonicus eng1<sup>Sj</sup>* gene, dissolved the septum more slowly than the wild type but faster than the non-transformed *eng1<sup>-</sup>* mutant. In summary we found that all these genes could partially complement the phenotypes of the *Sch. pombe* mutants defective in the homologue genes. So besides the sequence similarity, there is also functional interchangeability between the cell separation genes of the two related species.

In the *Sch. japonicus* mutant strains defective in *sep1<sup>Sj</sup>* or *ace2<sup>Sj</sup>* the mRNA level of the target genes were measured with qPCR. It was found that except for *cfh4<sup>Sj</sup>*, the mRNA level of all the examined genes (*agn1<sup>Sj</sup>*, *eng1<sup>Sj</sup>*, *mid2<sup>Sj</sup>*, *adg1<sup>Sj</sup>*) decreased in both *Sch. japonicus* mutant strains. So we suppose that the Sep1p<sup>Sj</sup> and Ace2p<sup>Sj</sup> proteins regulate the transcription level of *agn1<sup>Sj</sup>*, *eng1<sup>Sj</sup>*, *mid2<sup>Sj</sup>*, *adg1<sup>Sj</sup>* genes in the *Sch. japonicus* like their counterparts regulate the homologues target genes of *Sch. pombe*. The mRNA level of *cfh4<sup>Sj</sup>* is not influenced by the Sep1p<sup>Sj</sup> and Ace2p<sup>Sj</sup> transcription factors in *Sch. japonicus*.

The Eng1p<sup>Sj</sup>, Agn1p<sup>Sj</sup> and Mid2p<sup>Sj</sup> proteins were tagged with GFP, and the localisation of the tagged proteins within the cell were examined with fluorescence microscopy. The exact localisation of Agn1<sup>Sj</sup>-GFP és Eng1<sup>Sj</sup>-GFP proteins could not be determined because of technical problems. These fluorescent proteins could not leave the endoplasmatic reticulum because the GFP-tag probably disturbed the normal folding of the proteins. Further experiments are necessary to resolve this question. The Mid2p<sup>Sj</sup>-GFP protein was observed in the septal region of the cell, where it made a ring-like structure. Based on this, Mid2p<sup>Sj</sup> has probably similar function in *Sch. japonicus* as its counterpart in *Sch. pombe*: it makes a ring with the septin proteins, and helps the correct localisation of the Agn1<sup>Sj</sup> and Eng1<sup>Sj</sup> enzymes.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Sipiczki Mátyásnak, aki biztosította a doktori munka elvégzéséhez szükséges feltételeket és szakmai tanácsaival végig segítette haladásomat.

Hálával tartozom a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék valamennyi munkatársának az önzetlen segítségért.

Nagyon köszönöm a Magyar Ösztöndíj Bizottságnak, hogy az Eötvös Ösztöndíj keretein belül 3 hónapot tölthettem Spanyolországban a Salamancai Egyetemen, s egyúttal köszönöm Dr. Carlos Vazquez de Aldana-nak az Instituto de Biología Funcional y Genómica/CSIC Universidad de Salamanca tanszékvezetőjének, hogy fogadott és segítette ottani munkámat.

Köszönöm a Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszéknek és vezetőjének Dr. Pócsi Istvánnak pályám korai szakaszában nyújtott támogatását, illetve dr. Molnár Mónikának és dr. Lukács Gyöngyinek az alapvető genetikai módszerek megtanítását.

Hálásan köszönöm családomnak, hogy lelki és anyagi támogatásuknak köszönhetően eljuthattam ideig.

## 9. Irodalom

- Alfa C. E. & Hyams J. S.** (1990) Distribution of tubulin and actin through the cell division cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*: a comparison with *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **96**: 71-77.
- Alonso-Nuñez M. L, An H, Martín-Cuadrado A. B, Mehta S, Petit C, Sipiczki M, del Rey F, Gould K. L. & de Aldana, C. R. V.** (2005) Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **16**: 2003-2017.
- Amoah-Buahin E, Bone N. & Armstrong J.** (2005) Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **4**:1287-1297.
- Bardin A. J. & Amon A.** (2001) MEN and SIN: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:815-826.
- 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.
- Bensen E. S, Filler S. G. & Berman J.** (2002) A forkhead transcription factor is important for true hyphal as well as yeast morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **1**:787-798.
- Berlin A, Paoletti A. & Chang F.** (2003) Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J Cell Biol* **160**:1083-1092.
- Bölker M.** (2001) *Ustilago maydis*-a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**:1395-401.
- Broad Institute internetes honlap címe:** [http:// www.broadinstitute.org /annotation /genome/schizosaccharomyces\\_group/GenomeDescriptions.html'](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/GenomeDescriptions.html)
- Bähler J.** (2005) A transcriptional pathway for cell separation in fission yeast. *Cell Cycle* **4**: 39-41.
- Bähler J, Wu J. Q, Longtine M. S, Shah N. G, McKenzie A, Steever A. B, Wach A, Philippsen P. & Pringle J. R.** (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**:943-951.
- Byrne S. M. & Hoffmann C. S.** (1993) Six *git* genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **105**:1095-1100.
- Buck V, Ng S.S, Ruiz-Garcia A.B, Papadopoulou K, Bhatto S, Samuel J.M, Anderson M, Millar J.B & McInerny C.J.** (2004) Fkh2p and Sep1p regulate mitotic gene

transcription in fission yeast. *J Cell Sci* **117**:5623-5632.

**Bush D. A, Horisberger M, Horman I. & Wursch P.** (1974). The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiol* **81**:199-206.

**Calderone R. A.** (2002) *Candida* and Candidiasis. ASM Press, Washington DC

**Chomczynski P. & Sacchi N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159.

**Craven R. A, Griffiths D. J, Sheldrick K. S, Randall R. E, Hagan I. M. & Carr A. M.** (1998) Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **221**:59-68.

**Davis L.G, Dibner M.D & Battey J.F.** (1986) *Basic methods in molecular biology* Elsevier Science Publishers B.V, New York, Amsterdam, London.

**Dekker N, de Haan A. & Hochstenbach F.** (2006) Transcription regulation of the alpha-glucanase gene *agn1* by cell separation transcription factor Ace2p in fission yeast. *FEBS Lett* **580**:3099-3106.

**Dekker N, Speijer D, Grün C. H, van den Berg M, de Haan A. & Hochstenbach F.** (2004) Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell* **15**:3903-3914.

**Dickinson J. R.** (2008) Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae*—a review. *Folia Microbiol (Praha)* **53**:3-14.

**Dodgson J, Avula H, Hoe K. L, Kim D.U, Park H.O, Hayles J. & Armstrong J.** (2009) Functional genomics of adhesion, invasion, and mycelial formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **8**:1298-1306.

**Eissenberg L.G, Poirier S & Goldman W.E.** (1996) Phenotypic variation and persistence of *Histoplasma capsulatum* yeasts in host cells. *Infect Immun* **64**:5310-5314.

**Fantes P. A.** (1984) Cell cycle control in *Schizosaccharomyces pombe* in the Microbial Cell Cycle (Eds: Nurse P, Streiblová E) pp:110-125 CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida

**Forsburg SL.** (1993) Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* **21**:2955-6

**Furuya K. & Niki H.** (2009) Isolation of heterothallic haploid and auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces japonicus*. *Yeast* **26**:221-233.

**Funakoshi M. & Hochstrasser M.** (2009) Small epitope-linker modules for PCR-based C-terminal tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **26**:185-92.

**Gancedo J. M.** (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**:107-123.

- García I, Jiménez D, Martín V, Durán A. & Sánchez Y.** (2005) The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* **97**:569-576.
- Genscript honlapja:** [http://www.genscript.com/vector/SD1162-pUC18\\_plasmid\\_DNA.html](http://www.genscript.com/vector/SD1162-pUC18_plasmid_DNA.html)
- Gimeno C.J, Ljungdahl P.O, Styles C. A. & Fink G. R.** (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**:1077-1090.
- Guilliermond A.** (1920) The yeasts. John Wiley and Sons, New York
- Goffeau A, Barrell B. G, Bussey H, Davis R. W, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J. D, Jacq C, Johnston M, Louis E. J, Mewes H.W, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H & Oliver S.G.** (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**:546-567.
- Gold S, Duncan G, Barrett K & Kronsta J.** (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* **8**:2805-2816.
- Gow N.A. & Gooday G.W.** (1987) Cytological aspects of dimorphism in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* **15**:73-78.
- Gow N.A.** (1994) Growth and guidance of the fungal hypha. *Microbiology* **140**: 3193-3205.
- Guo W, Sacher M, Barrowman J, Ferro-Novick S. & Novick P** (2000) Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol* **10**:251-255.
- Griffiths A.J.F, Miller J.H Suzuki D.T, Levontin R.C & Gelbart W.M.** (2000) Yeasts: genetic models for the cell cycle in An introduction to genetic analysis. W. H. Freeman and Company New York
- Hall P. A, Todd C. B, Hyland P. L, McDade S. S, Grabsch, H, Dattani M, Hillan K. J. & Russell S. E. H.** (2005) The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors. *Clin Cancer Res* **11**:6780-6786.
- Helston R. M, Box J. A, Tang W. & Baumann, P.** (2010) *Schizosaccharomyces cryophilus* sp. nov. a new species of fission yeast. *FEMS Yeast Res* **10**:779-786.
- Horisberger M. & Rouver-Vauhey M.** (1985) Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* **41**:748-750.
- Hornby J.M, Jensen E.C, Liseac A.D, Tasto J.J, Jahnke B, Schoemaker R, Dussault P & Nickerson K.W.** (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**:2982-2992.
- Houwink A. L. & Kregerd R** (1953). Observations on the cell wall of yeasts. An electron microscope and X-ray diffraction study. *Antonie van Leeuwenhoek* **19**:1-24.
- Iuchi S.** (2001) Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**:625-635.

- Johnson B.F, Yoo B.Y. & Calleja G.B.** (1973) Cell division in yeasts: movement of organelles associated with cell plate growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **115**:358-366.
- Kamran M, Calcagno A.M, Findon H, Bignell E, Jones M. D, Warn P, Hopkins P, Denning D. W, Butler G, Rogers T, Mühlischlegel F. A. & Haynes, K.** (2004) Inactivation of transcription factor gene *ACE2* in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryot Cell* **3**:546-552.
- Kaufmann E. & Knöchel W.** (1996) Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* **57**:3-20.
- Kelly M. T, MacCallum D. M, Clancy S. D, Odds F. C, Brown A. J. P. & Butler G.** (2004) The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol* **53**:969-983.
- Krapp A, Gulli M.P. & Simanis V.** (2004) SIN and the art of splitting the fission yeast cell. *Curr Biol* **14**:722-730.
- Krapp A. & Simanis V.** (2008) An overview of the fission yeast septation initiation network (SIN). *Biochem Soc Trans* **36**:411-415.
- Lee M. G. & Nurse P.** (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* **327**:31-35.
- Lengeler K. B, Davidson R. C, D'souza C, Harashima T, Shen W. C, Wang P, Pan X, Waugh M. & Heitman J.** (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:746-785.
- Leupold U.** (1950) Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces Pombe*. *Ctes rend Lab Carlsberg Sér Physiol* **24**:381-480.
- Lin X.** (2009) *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* **9**:401-416.
- MacNeill S. A. & Nurse P.** (1997) Cell cycle control in fission yeast in *The Molecular and Cellular biology of the yeast Saccharomyces*, Cell Cycle and Cell Biology (eds. Pringle J.R, Broach J.R., Jones E.W.) pp: 698-713 Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Maresca B, Medoff G, Schlessinger D & Kobayashi G. S.** (1977) Regulation of dimorphism in the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Nature* **266**:447-448.
- Martín-Cuadrado A. B, del Dedo J. E, de Medina-Redondo M, Fontaine T, del Rey F, Latgé J. P. & de Aldana C. R. V.** (2008) The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3-beta-glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol Microbiol* **69**:188-200.

- Martín-Cuadrado A. B, Dueñas E, Sipiczki M, de Aldana C. R. V. & del Rey F.** (2003) The endo-beta-1,3-glucanase Eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**:1689-1698.
- Martín-Cuadrado A. B, Morrell J. L, Konomi M, An H, Petit C, Osumi M, Balasubramanian M, Gould K. L, Rey F. D. & de Aldana C. R. V.** (2005) Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell* **16**:4867-4881.
- Maundrell K.** (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**:127-130.
- Maundrell K.** (1990) *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**:10857-10864.
- Mitchison M.** (1970) *Physiological and cytological methods for Schizosaccharomyces pombe* In *Methods in Cell physiology*, pp 131-165, Academic Press, New York
- Moreno S, Klar A. & Nurse, P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**:795-823.
- Moser B.A. & Russell P.** (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* **3**:631-6.
- Mulhern S. M, Logue M. E. & Butler G.** (2006) *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryot Cell* **5**:2001-2013.
- Munz P, Wolf K, Kohli J. & Leupold U.** (1989) *Genetics overview in Molecular biology of the fission yeast* (eds. Nasim A, Young P, Johnson BF), pp:1-25, Academic Press, INC. San Diego California.
- NCBI** conserved domain adatbázis internetes honlap címe: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>
- NCBI glossary** internetes honlap címe: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21106/>
- Nadal M, García-Pedrajas M. D. & Gold S. E.** (2008) Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **284**:127-134.
- Nurse P, Thuriaux P. & Nsamyth P.** (1976) Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molec Gen Genet* **146**:167-178.
- Nurse P.** (1993) The welcome lecture, 1992. Cell Cycle Control *Phil Trans R Soc Lond B* **341**:449-454.
- Odds F.C.** (1988) *Candida and Candidosis*. Philadelphia Bailliere Tindall
- Orlowski M. & Ross J. F.** (1981) Relationship of internal cyclic AMP levels, rates of

protein synthesis and *Mucor* dimorphism. *Arch Microbiol* **129**:353-356.

**Papadopoulou K, Ng S. S, Ohkura H, Geymonat M, Sedgwick S. G. & McNerny C. J.** (2008) Regulation of gene expression during M-G1-phase in fission yeast through Plo1p and forkhead transcription factors. *J Cell Sci* **121**:38-47.

**Petit C. S, Mehta, S, Roberts R. H. & Gould K. L.** (2005) Ace2p contributes to fission yeast septin ring assembly by regulating *mid2*<sup>+</sup> expression. *J Cell Sci* **118**:5731-5742.

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

**Ribár B, Bánrévi A. & Sipiczki M.** (1997) *sep1+* encodes a transcription-factor homologue of the HNF-3/forkhead DNA-binding-domain family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **202**:1-5.

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

**Sabie F.T. & Gadd G.M.** (1992) Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) and germ tube formation in *Candida albicans*. *Mycopathologica* **119**:147-156.

**Sambrook J. & Fritsch EF M. T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York

**Simanis V.** (2003) The mitotic exit and septation initiation networks. *J Cell Sci* **116**:4261-4262.

**Simanis V.** (1995) The control of septum formation and cytokinesis in fission yeast. *Semin Cell Biol* **6**:79-87.

**Singh G. & Klar A. J. S.** (2003) DNA sequence of the *mat2,3* region of *Schizosaccharomyces kambucha* shares high homology with the corresponding sequence

from *Sch. pombe*. *Yeast* **20**:1273-1278.

**Singh G. & Klar A. J. S.** (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.

**Sipiczki M.** (2007) Splitting of the fission yeast septum. *FEMS Yeast Res* **7**:761-770.

**Sipiczki M.** (2000) Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* **1**: reviews 1011.1-1011.4.

**Sipiczki M. & Bozsik A.** (2000) The use of morphomutants to investigate septum formation and cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol* **174**:386-392.

**Sipiczki M. & Ferenczy L.** (1977) Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* Auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol Gen Genet* **151**:77-81.

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

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

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

**Sveiczzer A, Csikasz-Nagy A, Gyorffy B, Tyson JJ & Novak B.**(2000) Modeling the fission yeast cell cycle: quantized cycle times in *wee1<sup>-</sup>cdc25 $\Delta$*  mutant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7865-70.

**Su S.S.Y & Yanagida M.** (1997), *Mitosis and cytokinesis in the fission yeast, Schizosaccharomyces pombe* in *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces* (eds. Pringle J.R, Broach J.R, Jones E.W.) pp: 766-769 Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sudbery P, Gow N. & Berman J.** (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**:317-324.

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

**Trilla J.A, Cos T, Duran A. & Roncero C.** (1997) Characterization of *CHS4* (*CAL2*), a Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Involved in Chitin Biosynthesis and Allelic to *SKT5* and *CSD4* *Yeast* **13**:795–807.

**Van Der Walt J.P. & Yarrow D.** (1984) Formation of pseudomycelium and true mycelium in *The yeast a taxonomic study* (ed. N.J.W. Kreger-van RG) pp: 56-59 Elsevier Science

Publishers B.V. Amsterdam

**Wang H, Tang X, Liu J, Trautmann S, Balasundaram D, McCollum D. & Balasubramanian M. K.** (2002) The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **13**:515-529.

**Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E. & Jäckle H.** (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**:645-658.

**Yarrow D.** (1984) Standard description of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* and var. *versatilis* in The yeast a taxonomic study (ed. N.J.W. Kreger-van RG) pp: 415-418 Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam

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

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