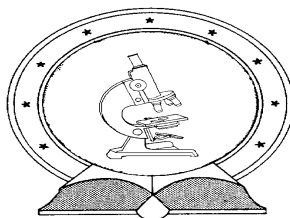


DE TTK

Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék



1949

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

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Papp László Attila

témavezető neve: Gálné Dr. Miklós Ida

Tanszékvezető, egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2015

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2015. október 27.

Papp László Attila
doktorjelölt

Tanúsítom, hogy Papp László Attila doktorjelölt 2010 - 2013 között a fent megnevezett Doktori Iskola, Biológia programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2015. október 27.

Gálné Dr. Miklós Ida
témavezető

A dimorfizmus genetikai hátterének vizsgálata *Schizosaccharomyces japonicus*-ban

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

Írta: Papp László Attila okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Gálné Dr. Miklós Ida
Tanszékvezető, egyetemi docens

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Borbély György.....

tagok: Dr. Pfeiffer Ilona

Dr. Emri Tamás

A doktori szigorlat időpontja: 2013.11.14.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2016.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés és célkitűzés	7
II. Irodalmi áttekintés	10
II.1 Dimorfizmus a patogén gombákban	10
II.2 Dimorfizmust befolyásoló környezeti tényezők	12
II.2.1 Hőmérséklet érzékelés.....	13
II.2.2 A pH érzékelése.....	17
II.2.3 A tápanyag érzékelése	20
II.3 Környezet érzékelés integrált útvonala: cAMP-PKA és MAPK jelátvitel.....	26
II.4 Egyéb környezeti faktorok	31
II.5 A hasadó élesztők, mint modell szervezetek.....	32
II.6 A <i>Sch.japonicus</i> jellemzői.....	34
III. Anyag módszerek	35
III.1 Felhasznált törzsek.....	35
III.2 Felhasznált táptalajok.....	35
III.3 Klasszikus módszerek.....	37
III.3.1 Az élesztő-hifa átváltás vizsgálata	37
III.3.2 Az adenin és guanin hatása az élesztő-hifa átváltásra.....	37
III.3.3 Vas (II) és Vas (III) ionok hatása a hifázásra.....	38
III.3.4 Glükóz, élesztőkivonat, pepton és agar koncentráció	38
III.3.5 Aminosavak, vitaminok, nyomelemek hatása az élesztő-hifa átváltásra.....	38
III.3.6 Stressz vizsgálat	39
III.3.7 FBS indukció.....	40
III.3.8 Élesztő vakuólum festés.....	41
III.3.9 Mikroszkópos mérések.....	41
III.3.10 A pH hatása az élesztő-hifa átváltásra	42
III.3.11 Szeptum festés.....	42

III.3.12 Hifa izolálása YPA szilárd táptalajból	42
III.4 Molekuláris módszerek	43
III.4.1 Genomiális DNS izolálása <i>Sch.japonicus</i> ból üvegyöngy segítségével	43
III.4.2 A <i>pka1</i> mutáns készítéséhez használt primerek	45
III.4.3 A <i>pka1</i> gén amplifikációja	46
III.4.4 A KanMX6 kazetta felszaporítása	47
III.4.5 A felszaporított <i>pka1</i> klónozása pJET1.2/blunt vektorba ..	48
III.4.6 Baktérium transzformálás	49
III.4.7 Colony PCR	49
III.4.8 Plazmid izolálás baktériumból	50
III.4.9 Restrikciós emésztés és ligálás.....	51
III.4.10 DNS agaróz gélből történő visszaizolálása	52
III.4.11 KanMX6 kazetta ligálása pJET1.2/blunt + <i>pka1</i> szegélyi régión tartalmazó plazmidba	52
III.4.12 A <i>Sch.japonicus</i> transzformálása elektroporátorral	53
III.4.13 Agaróz gélelektroforézis	54
III.4.14 RNS izolálás <i>Sch.japonicus</i> ból	55
III.5. Bioinformatikai módszerek.....	56
IV. Eredmények	57
IV.1.1 <i>Sch.japonicus</i> tenyésztési körülményének vizsgálata.....	57
IV.1.2 Dimorfizmus befolyásoló külső környezeti körülmények hatásának vizsgálata.....	57
IV.1.3 A pH hatása a morfológiai átváltásra.....	58
IV.1.4 A hőmérséklet hatása a morfológiai átváltásra	59
IV.1.5 Pepton hatása a morfológiai átváltásra	59
IV.1.6 Aminosavak hatása a hifaképzésre	61
IV.1.7 Adenin és guanin hatása a hifaképzésre.....	63

IV.1.8 Vitaminok és nyomelemek hatása	64
IV.2 Hifás átváltás indukciója folyékony tápközegben	64
IV.2.1 Minimál tápfolyadék és ozmotikus stressz hatása	65
IV.2.2 FBS (Fetal Bovine Serum) indukció.....	65
IV.3 Hifaképzésben szerepet játszó gének.....	68
IV.3.1 RNS izolálás és szekvenálás élesztő és hifás állapotú <i>Sch.japonicus</i> ból	68
IV.3.2 A <i>pka1</i> gén bioinformatikai analízise	72
IV.4 A Protein kináz A (PKA) gén törélése a <i>Sch.japonicus</i> kromoszómájáról.....	74
IV.4.1 <i>pka1</i> deléciós konstrukciójának elkészítése.....	74
IV.4.2 <i>Sch.japonicus</i> 7-1 törzsének transzformálása elektroporátorral	78
IV.5 A protein kináz A (<i>pka1^{Sj}</i>) mutáns jellemzése.....	81
IV.5.1 A <i>pka1</i> deléciós mutáns sejt morfológiája	81
IV.5.2 A <i>pka1</i> mutáns morfológiai átváltásának vizsgálata.....	81
IV.5.3 Spórázás vizsgálata	84
IV.5.4 Stressz vizsgálatok	86
IV.5.5 A <i>pka1</i> által szabályzott gének azonosítása	89
IV.5.5.1 RNS szekvenálás <i>pka1</i> mutánsból.....	89
IV.5.5.2 A <i>pka1</i> szerepének kiderítése a morfológiai átváltásban.....	92
IV.5.5.3 <i>pka1</i> target gének összehasonlítása <i>Sch.pombe</i> és <i>Sch.japonicus</i> fajokban	93
V. Diskusszió	96
VI. Összefoglalás.....	102
VII. Köszönetnyilvánítás	105
VIII. Irodalom	106
IX. Függelék.....	123

I. Bevezetés és célkitűzés

A dimorfizmus a gombák azon képessége, hogy különböző stimulusok hatására, a sejtek kétféle megjelenési formában szaporodnak, vagy élesztősejtet vagy hifát formálnak, melyet csúcsi növekedés jellemez. A természetben ez a jelenség nemcsak az adaptálódásban segít, hanem például lehetőséget teremt a patogén gombáknak a gazdaszervezet fertőzésére.

Számos gomba képes növényeket, állatokat, és embereket fertőzni, mások pedig szaprofita módon a talajban élnek és az ottani szerves anyagokat használják az életfolyamataik fenntartásához. Azon fajok, melyek dimorfizmussal rendelkeznek, jobban terjeszkedhetnek, adaptálódhatnak, vagy élhetnek olyan speciális körülmények között, melyek más, egysejtes rokonaik számára végzetesnek bizonyulnának. A dimorf patogén gombák között vannak olyanok, melyek a mezőgazdaságban súlyos károkat okoznak azzal, hogy a gazdanövényt elpusztítják, vagy fogyasztásképtelenné teszik a terményt. Ilyen például a kukorica veszedelmes, mikroszkopikus kártevője az *Ustilago maydis*, mely a növényi szövetek búrjázását idézi elő (Gao, 2013). (1. ábra A) A *Fusarium* genusz tagjai szintén nagy károkat okoznak a mezőgazdaságnak, melyek között vannak olyan fajok, melyek toxinokat termelnek, és ezek a terményekkel bekerülhetnek az emberi és állati szervezetekbe (Sobrova és mtsai, 2010) (1. ábra B).



1. ábra: Hírhedt növény patogén gombák által okozott károk. **A)** *Ustilago maydis* (Virók Viktor képe); **B)** *Fusarium oxysporum*. (Missouri Botanikus Kert képe) [1, 2]

A *Cryptococcus neoformans* tüdőgyulladás-szerű megbetegedést és meningitist okoz olyan emberekben, akiknek valamilyen ok folytán gyengébb az immunrendszere. (Steen és mtsai, 2002) A patogén gombáknál említést kell tenni a dimorf *Candida albicans*-ről, mely normál esetben, egy a bélben előforduló mikroorganizmus, a bélflóra alkotója (Jacobsen és mtsai, 2012). Az immunrendszer gyengülése következtében viszont súlyos megbetegedéseket, akár halált is okozhatnak (Pfaller és mtsai, 2006; Mayer és mtsai, 2013).

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

A dimorfizmus genetikai háttere bioinformatikai és kísérletes adatok alapján nagyfokú konzerváltságot mutat a gombák világában, ebből kifolyólag a nem patogén, de dimorfizmust mutató organizmusok is kiváló

modellszervezetek lehetnek, melyek segíthetnek e tulajdonság háttérében meghúzódó molekuláris folyamatok részletesebb megismerésében. A különböző fajokban kapott eredmények összehasonlítása pedig rávilágíthat a morfológiai átváltás fajspecifikus elemeire is.

Éppen ezért a tanszékünkön a *Schizosaccharomyces japonicus* hasadó élesztővel kezdtünk el dolgozni, mely a gombák egy különleges, evolúciós szempontból korán leágazó csoportjába tartozik. Ez a faj a *Schizosaccharomycetales* genusz filogenetikailag legidősebb tagja, mely megőrizte a valamikori közös ős dimorfizmusra való képességét (Sipiczki, 1995). Ráadásul haploid, így a génmanipulációk következményei azonnal megnyilvánulnak és könnyen tanulmányozhatók.

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

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

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

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

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

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

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

II. Irodalmi áttekintés

II.1 Dimorfizmus a patogén gombákban

A dimorfizmus szó szerint két formában való előfordulást jelent. A gombák esetében ez például a diffúz vagy kompakt hifa sűrűséget, vagy a spóráképzést is jelentheti. A leggyakrabban viszont egy képesség leírására használják, mely során a gomba képes élesztő (egysejtes) állapotból fonalas (micélium) növekedési formába, vagy fonalassal élesztő formába átváltani (Kadosh, 2013).

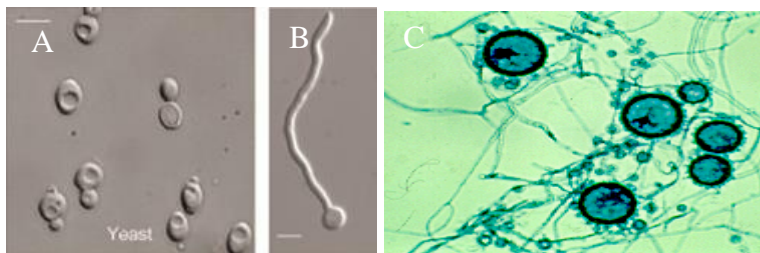
A dimorfizmust mutató gombafajok élettere széles körben változik. Egyesek valamilyen természetes anyag lebontását végzik, mint pl. a *Yarrowia lypolytica*, mely szénhidrogéneket képes degradálni (Spencer és mtsai, 2002). Ezzel ellentétben a *Candida albicans* (2. ábra A), a *Cryptococcus neoformans* vagy a *Histoplasma capsulatum* (2. ábra C) humán patogén gombák, képesek a dimorfizmusukkal az immunszuppresszált szervezet kolonizálására (Noble és Johnson, 2007). Ugyanakkor mások növényekben élnek. A kukorica veszedelmes dimorf patogénje az *Ustilago maydis*, vagy a veszélyes toxinokat termelő *Fusarium oxysporum* egyaránt morfológiai átváltás segítségével képes a gazdanövényeket fertőzni (Michielse és mtsai, 2009; Elias-Villalobos és mtsai, 2011).

Bár az élőlények élettere különbözik, viszont a környezetükben bekövetkező változásokra (pl. alacsony hőmérséklet, pH hatására) hasonló módon válaszolnak (Ruiz-Herrera és Sentandreu, 2002; Mayer és mtsai, 2013).

Egyesekről általánosan elmondható az, hogy a fonalas formájuk az invazív, mely képes a szubsztrátba belenőni, míg az élesztő fázisú sejtek könnyebben szétszóródnak (terjeszkedés) és nagyobb stressztűrővel rendelkeznek (Isaac, 1996).

Míg másokra, például emberi megbetegedéseket okozó gombákra (a *Hystoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* és *Paracoccidioides brasiliensis*) az jellemző, hogy a környezetben fonalas formában növekednek, viszont gazdaszervezetbe kerülve élesztő fázisba váltanak és így fertőznek (Maresca és Kobayashi, 1989). Ennek során az immunválasz sejtes elemeit kikerülhetik, illetve ez a forma szükséges a belső szervek inváziójához (Calderone és Fonzi, 2001). Sok tanulmány bizonyítja, hogy a dimorf átváltás elengedhetetlen a fertőzési mechanizmusukhoz. Ez azt is jelentheti, hogy a dimorfizmus sérülése az átváltás sikertelenségét okozza, ami azt eredményezheti, hogy egy ilyen gomba nem képes gazdaszervezet fertőzésre, és emiatt gyorsan elpusztul (Sánchez-Martínez és Pérez-Martin, 2001; Klein és Tebbets, 2007).

A morfológiai átváltás tanulmányozása ezért igen fontos és szükségszerű, ugyanis a molekuláris genetikai kapcsolatok felderítése segíthet például a dimorfizmusban szerepet játszó regulátor gének működésének megismerésében. Ha ismerjük az érintett géneket, akkor ezek potenciális célpontokká válhatnak, ami azt jelenti, hogy például egy embert fertőző patogén gombának célzottan „kihúzzhatjuk a méregfogát”, ami innentől kezdve a szervezet által könnyen eliminálható.



2. ábra: Humán patogén gombák fénymikroszkópos képe. **A)** *Candida albocans* élesztő és **B)** hifás állapotú sejtjei. (Peter Sudbery képe) **C)** *Hystoplasma capsulatum* élesztő és hifás sejtjei [3, 4]

A továbbiakban a dimorfizmust befolyásoló külső környezeti körülmények hatását vizsgáljuk meg.

II.2 Dimorfizmust befolyásoló környezeti tényezők

A dimorfizmust a környezeti körülmények befolyásolják elsősorban, tulajdonképpen ez a külső-belső stimulusokra adott morfológiai válaszreakció. A környezeti körülmények közül a legfontosabbak: a hőmérséklet, pH, tápanyag koncentráció, oxigén szint (Bahn és Mühlshlegel, 2006; Nemecek és mtsai, 2007; Selvig és Alspaugh, 2011). A fenti faktorok a sejten belül lefordítódnak molekuláris jellé, melyet bonyolult, de egyben kifinomult jelátviteli folyamatok követnek.

Ahhoz, hogy a dimorfizmus mechanizmusát, szabályzását megértsük mind klasszikus, mind molekuláris vizsgálati módszerek szükségesek. A cél annak a meghatározása, hogy pontosan, melyek azok a specifikus külső körülmények, vagy belső állapotok, amelyek befolyásolják az élesztő - hifa átváltást.

A dimorfizmus kutatás szakirodalma alapján az élesztő-hifa átváltást három fő környezeti körülmény (minden dimorf gomba esetében) befolyásolja. Ezek **a hőmérséklet, a tápanyag** (koncentráció), és a **pH** (Samuel Baron, 1996; Ruiz-Herrera, 2012). Ehhez természetesen még több faktor is társulhat fajtól, élettértől és életmódtól függően, melyek az átváltás finomabb szabályzását teszik lehetővé (Klein és Tabbets, 2007; Cooney és Klein, 2008). Felvetődhet a kérdés, hogy miért kell ezekre a körülményekre morfológiai váltással válaszolni? Az élőlények túlélésének kulcsa az állandóan változó környezet érzékelésében és az ehhez való adaptációban rejlik. Ha például a *C. albicans* nem lenne képes érzékelni a megváltozott hőmérsékletet vagy, és emiatt dimorf váltása nem következne be, akkor a

szervezetten belül keletkezett immunválasz miatt elpusztulna (Lo és mtsai, 1997). A pusztulás bekövetkezhet például úgy, hogy a megváltozott hőmérsékleten a sejt fehérjéi károsodnak, funkcióképtelenné válnak.

A gomba élettér környezeti pH-jának érzékelése szintén nagyon fontos. Szélsőséges pH körülmények károsíthatják az extracellulárisan kibocsátott enzimeket, melyek funkcióképtelensége az organizmus defektív növekedését vagy pusztulását okozza. Tehát az azonnali válaszreakció nagyon fontos az adaptáció kialakításában illetve ebből következően a túlélésben. Ez például a *Candida albicans* esetében azt jelenti, hogy élesztő fázisban például más szekretált aszpartil proteáz (SAP-ok) gének expressziója történik, mint hifás állapotban (Naglik és mtsai, 2003).

Összegezve az előző gondolatmeneteket látható tehát az, hogy például a dimorf patogén gombáknak szükséges, hogy az élesztő - hifa átváltással reagáljanak a környezetük változására. Hogy milyen módon képesek ezeket a fizikai/kémiai állapotokat érzékelni, a továbbiakban ezekről lesz szó.

II.2.1 Hőmérséklet érzékelés

Ismert tény az, hogy a humán patogén gombák egy része **25°C –on fonalas** formában, a környezetben szaprofita életmódot folytat. Viszont ha gazdaszervezetbe kerül, például belégzéssel, akkor a test **37°C-os hőmérséklete indukálja a morfológiai átváltást**, és unicelluláris formát öltve fertőzőképesé válik. Ilyen például a *H.capsulatum* humán patogén, amely a hőmérsékletváltozást három „lépcsősen” érzékeli. Az első fázisban egy gyors intracelluláris ATP csökkenést figyeltek meg melyet az oxidatív foszforiláció szétkapcsolása követ. 24-40 óra elteltével a sejt belép a második fázisba, melyet 4-6 napig tartó nyugalmi periódus követ. Erre az állapotra az jellemző, hogy a sejtek meglehetősen kevés mitokondriális

elektron transzport komponens tartalmaznak. A harmadik állapotban tulajdonképpen a citokróm rendszer helyreáll, beindul a légzés, valamint egy fázisspecifikus cisztein oxidáz aktiválódik, végül pedig kialakul az élesztő morfológia (Medoff és mtsai, 1986).

A kérdés a továbbiakban az volt, hogy a hőmérsékletváltozás közvetlenül hat-e a sejtre vagy közvetett úton történik az érzékelés? A válasz az, hogy mindkét módon. Leach és Cowen szerint négy módon érzékelhető a hőmérséklet egy sejt számára: membrán-fluiditás változással, unfolded protein response-al (letekeredett fehérje válassz), RNS hőmérőkkel (RNA thermometers) valamint a Hsf1 transzkripciós faktoral (Shapiro és Cowen, 2012; Leach és Cowen, 2014).

A membrán fluiditás változás hőmérsékletfüggő. A sejt attól függően, hogy milyenek a hőmérsékleti körülmények, képes membránjának a telített és telítetlen zsírsav összetételét szabályozni. Alacsonyabb hőmérséklet (15°C) esetén a telítetlen, míg magasabb hőmérsékleten (37°C) a telített zsírsavak dominálnak. A *H. capsulatum* esetében végeztek érdekes kísérletet, mely során párhuzamosan emelték a hőmérsékletet és a palmitinsav koncentrációt, s ez azt eredményezte, hogy a HSP82 protein transzkripciója növekedett. Ezzel ellentétesen, telítetlen zsírsav pl. olajsav és növekvő hőmérsékleti körülmények csökkentették a transzkripciós szintet (Shapiro és Cowen, 2012; Leach és Cowen, 2014). A *C. albicans* esetében a membrán fluiditást az *OLE1*-zsírsav deszaturáz regulálja, melynek transzkripciós szintje a hőmérséklet emelkedése során csökken. (Leach és Cowen, 2014) Kutatási eredmények szerint az *OLE1* szükséges a virulenciához (Xu és mtsai, 2009). Az *OLE1* kapcsolatban áll a *HSF1* transzkripciós faktoral, mely az előbbin keresztül közvetíti a hőmérséklet érzékelést. A *HSF1* ugyancsak elengedhetetlen a *C. albicans* teljes virulenciájához (Nicholls és mtsai, 2011). A *C. neoformans* esetében azonosítottak egy transzkripciós

aktivátort, az *MGA2*-t, melynek szintje megemelkedett, ha 25°C-helyett 37°C-on szaporították a sejteket. Az *MGA2* regulálja az *OLE1*- zsírsav deszaturáz transzkripcióját, ez azt jelenti, hogy a *C. neoformans* gazdaszervezet fertőzés során átrendezi a membrán szerkezetét (Kraus és mtsai, 2004).

A letekeredett fehérje válaszreakció (UPR) valamint a hősokk stressz válasz egymással szorosan összefüggnek. Stressz körülmények között, például a hőmérséklet emelkedésének hatására a fehérje homeosztázis gyakran felborul, ami letekeredett fehérjékhez és aggregátumok képződéséhez vezet. Metzger és mtsai. bebizonyították, hogy a *Saccharomyces cerevisiae*-nél a letekeredett fehérje válasz sejtes hőmérőként szolgálhat (Metzger és Michaelis, 2009). Ennek három fő válasza lehet három kompartmentből: az ER-, a citoplazma- és a membrán válasz. Ha az ER-ban rosszul feltekeredett fehérjét detektál a sejt, akkor erre az ER chaperonok, a *KAR2* és *HAC1* expressziójával, citoplazmatikus esetben az *SSA4* (*hsp70*) és *STI1*-aktiválásával lát el chaperon funkciót (Shapiro és Cowen, 2012; Leach és Cowen, 2014). A membránproteinek szerkezeti változásának érzékeléséért közvetetten az Rpn4 transzkripciós aktivátor felel (Shapiro és Cowen, 2012; Leach és Cowen, 2014). Ezeket a megfigyeléseket persze humán patogének esetében is leírták. Az *A. fumigatus* humán gazdaszervezet fertőzése során, egy nagyfokú transzkripciós szintemelkedésen megy keresztül, melynek végeredménye egy nagyfokú fehérje szintézis. Ilyenkor előfordulhat, hogy az ER-ban sok fehérje nem megfelelő térszerkezetet vesz fel, melyek toxikus fehérje aggregátumokat eredményezhetnek. Ilyenkor az Ire1 ER stressz szignál aktiválódik, mely aktiválja a *HAC1*-et, ami az aggregátumokat szétvagdálja. *C. neoformans*-esetében az Ire1 aktiváció még az elleni rezisztanciával is párosul (Shapiro és Cowen, 2012; Leach és Cowen, 2014). Habár ez a hőmérsékletmérés egy

jól működő visszacsatolós rendszer, sok transzkripcionális és translációs eseménynek kell történnie, míg a fentebb említett „hőmérő fehérjék” kifejtik hatásukat.

Az RNS hőmérők ezzel szemben a hőmérsékletváltozást sokkal gyorsabban képesek érzékelni, olyan módon, hogy kontrollálni tudják az mRNS translációt. *S.cerevisiae*-vel 23°C-tól 75°C-ig végzett hősokk kísérletben több transzkriptum relatív olvadáspontját határozták meg, így sok feltételezett RNS hőmérőt azonosítva. Megállapították, hogy az alacsony olvadáspontú RNS-ek könnyen kitekerhetők, dinamikusak, míg a magas olvadásponttal rendelkező RNS-ek stabilak, nagy energia befektetéssel tekerhetők ki. Így a végső konklúzió az, hogy a szerkezetileg legstabilabb mRNS-ek szintje a hősokk ideje alatt alig változott, míg az alacsony olvadásponttal rendelkező mRNS-ek transzkripciós szintje tartósan alacsony volt (Shapiro és Cowen, 2012; Leach és Cowen, 2014).

Végezetül említést kell tenni a **Hsf1-HSP90 autoregulációs körőről**. A Hsf1 egy transzkripciós faktor mely konzervált az eukariótákban. Aktivációja a hősokk proteinek szintjének emelkedését eredményezi. *S.cerevisiae*-ben és a patogén gombákban egyaránt a Hsf1 foszforiláció általi aktivációja figyelhető meg 30°C-ról 42°C-ra történő váltás után és regulálja a HSP90, HSP104 és HSP70-fehérjék expresszióját (Shapiro és Cowen, 2012; Leach és Cowen, 2014). Miután a sejt adaptálódott az emelkedett hőmérséklethez, a Hsf1 alacsonyabb mRNS szintje volt megfigyelhető, amit a hősokk proteinek megemelkedett szintje okozott, ezzel feltételezve a fehérjék közötti kölcsönhatás létezését. Később kísérletesen ezt úgy igazolták, hogy a HSP90-hez GFP-jelölést adtak, majd hősokkolva a sejtet vizsgálták, a fehérje lokalizációját. 60 perc eltelte után a HSP90-GFP a sejtmagban lokalizálódott, ezzel bizonyítva a kölcsönhatás, valamint az

autoregulációs kör létezését (Shapiro és Cowen, 2012; Leach és Cowen, 2014).

II.2.2 pH érzékelés

Mint azt fentebb a hőmérséklet esetében is láthattuk, úgy a pH homeosztázis felborulása is minden élő szervezetre káros hatással van, az organizmus túlélése a szigorú és kifinomult szabályzáson múlik. Ahhoz, hogy egy sejt optimálisan működjön, szükséges egy stabil, intracelluláris pH szint fenntartása, melyben több komplex vesz részt, s mely több folyamatra is kihat. Ilyen az ember esetében a H^+/K^+ ATP-áz, mely a pH egyensúly hiányában, sok egyéb probléma mellett, például a gyomorsav termelés elmaradását eredményezheti (Freeman, 2000). Növények esetében a pH szabályzás a normális fejlődéshez, a másodlagos transzportfolyamatokhoz, elengedhetetlen (Morsomme és Boutry, 2000). Nem utolsó sorban nagyon fontos említést tenni a mitokondriális F1F0 ATP-ázok szerepéről, melyek mind a növények mind az állati és gomba sejtek számára, a proton gradiens hajtóerejét felhasználva, nagy mennyiségű ATP szintézisért felelnek (Freeman, 2003).

A gombák esetében több mechanizmus fejlődött ki a pH érzékelésre, hogy a sejt a hirtelen fellépő környezeti változásokra a lehető leghatékonyabban és leggyorsabban reagálhasson (Dunlap, 2011). Ha a patogén gombák csoportját vesszük, a gazdaszervezet fertőzése során, a gazdán belül szélsőséges pH-jú kompartmentek lehetnek, melyhez szükséges a támadónak adaptálódni, különben elpusztul. Itt nem csak a H^+ -koncentráció miatt működésképtelenné vált fehérjékről van szó, hanem a tápanyagfelvételhez szükséges proton gradiensről, melyet extrém alacsony H^+ -koncentráció mellett is biztosítani kell a sejtnek. Bizonyos, a

növekedéshez és patogenezishez esszenciális elemek, például a vas-ion oldékonysága is pH függő (Bignell, 2012). De a fonalas gombák által termelt proteázok, cellulázok, szintén rendkívül érzékenyek az extracelluláris pH-változásra (Dunaevsky és mtsai, 2000).

PacC/Rim101 szenzor

Sok tanulmány született, mely az *Aspergillus nidulans*-ban, és a *S. cerevisiae*-ben vizsgálta a pH érzékelés útvonalát. Az útvonal – *A.nidulans*-ban - központi komponense egy transzkripciós faktor a PacC, ami egy DNS kötő cinkujj protein, mely bázikus körülmények között proteolitikusan hasítódik (Bignell, 2012). A kaszkád folyamatot a következő szenzorok indítják: két feltételezett plazmamembrán fehérje (PalH/Rim21, Dfg16 és PalI/Rim9), Bro1 doménnel rendelkezők (PalC és PalA/Rim20) egy gomba specifikus arrestin (PlaF/Rim8), valamint egy kalpainszerű proteáz PalB/Rim13. Az érzékelés a következőképpen történik: közvetlenül a receptorok érzékelik a pH-t majd ez a Rim8 ubiquitinációját váltja ki, ami az endoszómális elosztó rendszer (ESCRT I/II/III), a Rim13 és Rim20 komponenseinek összeszerelődését segíti. A Rim20 kötődik a PacC/Rim101 C-terminális doménjéhez, és proteolitikus hasítást végezve eltávolítja a gátló domént, aktiválva ezzel a transzkripciós faktort. Ezután a PacC/Rim101 komplex a magba transzportálódik (Bignell, 2012; Maeda, 2012).

A fenti szenzoros rendszer vizsgálata során azt tapasztalták, hogy patogén gombák esetében a Rim101 útvonal nagymértékben befolyásolja a virulenciát. *C. albicans*-sal folytatott kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a PacC/Rim101 szignalizációs rendszer szükséges a szisztémás és szájgaratfertőzésekhez (Davis és mtsai, 2000; Nobile és mtsai, 2008). A Rim101 útvonalban sérült sejtek képesek hifázni, de internalizációjuk gyengébb, és

így ebből arra lehet következtetni, hogy a Rim101 szabályoz olyan sejtfelszíni fehérjéket, melyek a gazda-patogén kölcsönhatásban nagy szerepet játszanak. Erre a bizonyíték az volt, hogy egy *rim101Δ* törzssel megfertőzött egérben jelentősen kisebb sejtkárosodást tapasztaltak a kontrollhoz képest. A Rim101 –számos más virulencia gén mellett-szükséges egy, a virulenciában fontos szerepet játszó gén, az *ALS3* expressziójában (Nobile és mtsai, 2008). Ezt az agglutinin szerű fehérjét hifás állapotú sejtek termelik, és képes a gazda kadherinjeihez kihorgonyozódni, ami szükséges a gazda inváziójához. Az *ALS3* overexpressziója *rim101Δ* törzsben részlegesen ugyan, de képes visszaállítani a sejtkárosító hatást (Calderone és Fonzi, 2001; Nobile és mtsai, 2008; Bignell, 2012). Egy másik patogénben a *Cryptococcus neoformans*-ban a Rim101 deléció a kapszulaformálás defektusát és ennek következtében a virulencia csökkenését eredményezte. A defektust valószínűleg a sejtfelszíni megváltozott poliszaccharid elrendeződés okozhatta (Bignell, 2012). Olyan *A. fumigatus* mutánsok, melyek a PacC transzkripciós faktorban sérültek, nem voltak képesek invazív fertőzésre (Bertuzzi és mtsai, 2014).

pH homeosztázis gombákban

A glükóz lebontás során nagy mennyiségű CO₂ képződik, ez a sejten belül H⁺/HCO₃⁻ -formájában van jelen, mely a fő intracelluláris protonforrás. Ennek a folyamatosan képződő H⁺-nak el kell távolítódni a citoplazmából, ugyanis felhalmozódása veszélyezteti a sejt metabolikus stabilitását. Egyes eukarióta szervezetek ezt úgy oldják meg, hogy ATP felhasználás mellett protont pumpálnak ki az extracelluláris térbe, visszaállítva saját pH egyensúlyukat. Ilyen proton pumpa a Pma1, mely így energia felhasználás mellett elektrokémiai gradienst generál (Ambesi és mtsai, 2000). Gombák

esetében az ilyen pumpa esszenciális a hifás növekedéshez (Fajardo-Somera és mtsai, 2013). Ugyanúgy a gombákhoz tartozó, egy másik, hasonló működési elvű proton pumpa a vakuoláris ATP-áz (V-ATP-áz), mely a keletkező elektrokémiai gradiens által aminosavak transzportját teszi lehetővé a vakuólum membránon keresztül (Bignell, 2012). A V-ATP-ázok hibás működése esetén a gomba extrém lassú növekedést mutat, érzékeny mindenféle stressz hatásokra (Kane, 2006). *C. albicans*-on végzett kísérletek azt bizonyítják, hogy a patogén gombák virulenciájában is fontos szerepet tölt be a V-ATP-áz. A virulenciát tekintve, a *Candida albicans*-ban a vakuoláris transzport sérülése vagy biogenezisének elmaradása a hifás átváltás elmaradását eredményezi, ami így nem képes a gazdaszervezet fertőzésére (Palmer, 2011, Pérez-Martin, 2012).

A pH a dimorfizmusban szerepet játszó enzimekre is komoly hatással van. Ezt a kapcsolatot tükrözi a *C. albicans*-ban leírt sejtfal β -1,3 és 1,6 glükán keresztkötő enzimek (PHR1 és PHR2) kifejeződése eltérő pH-n (Davis, 2003). A PHR1 kifejeződése főleg pH5,5 vagy ez érték felett történik, alkalikus körülmények között, míg a PHR2-t a savas pH indukálja (Calderon és mtsai, 2010). Kísérleti eredmények igazolják, hogy ha a PHR1 funkciója kiesik, akkor a *C. albicans* virulenciája nagymértékben csökken. Továbbá transzkripciós elemzéssel megállapították, hogy a hifás növekedés fenntartásához (és nem az elinduláshoz) a PHR1 funkció feltétlen szükséges (Calderon és mtsai, 2010).

II.2.3 A tápanyag érzékelése

Egy organizmus tápanyag érzékelése lehetőséget ad arra, hogy az elérhető tápanyagforrást növekedésre, a túlélési stratégiák előkészítésére használja, valamint specifikus transzport rendszereket, és metabolikus

útvonalakat aktivizáljon (Rutherford, 2011). A tápanyagot a sejtek vagy intakt formában, vagy átalakítva (hidrolizálva, kelátolva) a plazma-membránon keresztül, szubsztrát-specifikus transzporterekkel veszik fel. A tápanyag jelenlétét érzékelő receptor továbbítja a jelet egy olyan kifinomult jelátviteli rendszeren keresztül, mely az eukarióták között nagy konzerváltságot mutat. Hangsúlyozni kell, hogy a jelátviteli hálózat és a tápanyag érzékelés egymással szorosan összefüggnek, emiatt szükséges mindkét terület ismertetése. Fontos megemlíteni, hogy nagyon sok faktor szerepelhet e témakörben, viszont a dolgozatban ezek közül csak szén- és nitrogénforrás, mint legfontosabb tápanyagfélésekről lesz szó.

Szénforrás érzékelés gombákban

A glükóz számos mikroorganizmus számára a kedvelt, elsődleges szénforrás és ezért gyakran limitáló tényező a környezetben. A mikroszervezetek egymással folytatott kompetíciója következtében kifinomult érzékelő rendszert alakítottak ki e cukor megszerzésére (Bahn és mtsai, 2007). *S.cerevisiae* borélesztő elég szélsőséges cukorkoncentrációkkal találkozik, mely lehet 1,5M-tól egészen mikromoláris mennyiség. Ennek megfelelően az élesztő bonyolult, és szigorúan szabályozott hexóz transzport rendszert fejlesztett ki, hogy a növekedéshez szükséges cukor intracellulárisan optimális mennyiségben legyen jelen. Ehhez rendelkezésre állnak hexóz transzporterek (Hxt1p-Hxt17p) és két specifikus glükóz szenzor (Snf3p, és Rgt2p) család. A Hxt transzporterek facilitált diffúzióval juttatják be a cukrot a sejtbe. Ezek a transzporterek eltérő affinitást mutatnak a különböző, környezetben előforduló cukorkoncentrációra. A *HXT1* és *HXT3* általában alacsony affinitással rendelkeznek, csak nagy koncentrációk esetén aktiválódnak. A *HXT2* és *HXT4* közepesen érzékenyek, míg a *HXT6* és *HXT7*

magas affinitással rendelkeznek, melyek már nagyon kis mennyiségű cukor jelenlétében is kifejeződnek (Kim és mtsai, 2013). Ezek a transzporterek érdekes visszacsatolási mechanizmussal rendelkeznek. Az Snf3p/Rgt2 útvonal közvetlenül detektálja a glükóz szintet, és így regulálja az erre megfelelő/szükséges hexóz transzporter expresszióját. A másik jelátvitel az Snf1p-Mig1p, mely a glükóz metabolizmusát érzékeli, és nagy glükóz koncentráció esetén gátolja a közepes és nagy affinitású transzporterek expresszióját (Kim és mtsai, 2013).

C. albicans esetében a glükóz, növekedésre és szaporodásra történő használata mellett nagyon fontos szerepet tölt be az élesztő-hifa átváltásban, így a virulenciában (Hudson és mtsai, 2004; Sabina és Brown, 2009). Ennek a patogénnek a transzporterei hasonlóak a *S.cerevisiae*-nél leírtakhoz. Nagy affinitású transzporterek a *HGT4*, *HGT10*, *HGT12*, míg glükóz szenzorként funkcionál a *Hgt4p* (Horák, 2013) A glükóz indukált repressziós rendszerük is hasonlóan működik, és meglehetősen nagy konzervativizmust mutat. A gazdaszervezeten belüli cukorkoncentráció szélsőséges értékek között mozog, így valamilyen téren összehasonlítható a gomba „helyzete” a *S.cerevisiae*-vel, és talán ezzel magyarázható a glükóz érzékelés és felvételbeli hasonlóság (Horák, 2013).

A fentiek a szénforrás érzékelés egy olyan módját tárgyalták, melyek a glükóz intracelluláris transzportját, és homeosztázisát befolyásolják. Ezzel párhuzamosan egy G-fehérje mediált jelátvitel is lezajlik, melyet a glükóz, mint ligand indít be. (Rolland és mtsai, 2002) A tápközegben lévő, extracelluláris glükóz érzékelése G-protein kapcsolt receptor (GPCR) segítségével történik. A receptor egy 7 transzmembrán doménnel rendelkező membránprotein, mely nagyszámú jelet továbbít a környezetből, szabályozva a metabolizmust, növekedést és fejlődést (Van Dijck, 2009). Például a *S.cerevisiae* GPCR (Gpr1) glükóz jelenlétében aktiválja a G fehérje alfa

alegységét (Gpa2) mely képes az adenilát cikláz (AC) enzimet aktiválni. Az AC cAMP-t szintetizál, mely másodlagos hírvivőként aktiválja a cAMP dependens PKA útvonalat (Thevelein és mtsai, 2005). Kísérletesen bebizonyították, hogy a GPCR-ről származó jel önmagában nem elég, az AC aktiválásához. Megállapították, hogy a glükóznak be kell jutni a sejtbe, és glükóz-6-foszfáttá alakulni, mely képes belső jelként (ismeretlen módon) a Ras szignalizációt beindítani. A Ras útvonal és a GPCR mediált jelzés együtt fogja az AC-enzimet aktiválni (Conrad és mtsai, 2014).

Gombák nitrogénforrás érzékelése

A nitrogénforrás megszerzése, homeosztázisa egy másik nagyon fontos faktor az élőlények számára. Nitrogén nélkül nem léteznek aminosavak, nukelobázisok, egyszóval élet, így ez is egy esszenciális biogén elem. A gombák számára a preferáltabb nitrogénforrások az: NH_4^+ , NO_2^- / NO_3^- -ionok, de ide tartoznak az aminosavak és az urea, melyek szintjét mind intra- és extracellulárisan képes érzékelni a sejt (Graeme M. Walker, 1998).

Az ammónium-ion érzékelés terén az összes eddig tanulmányozott gombára igaz az, hogy legalább két NH_4^+ -permeázsal rendelkeznek, melyek az AmtB/Mep/Rh konzervatív protein családkhoz tartoznak, ahol a Mep2 *C. albicans*-ban és *S. cerevisiae*-ben szenzor funkcióval is rendelkezik. Ez a transzporter és érzékelő funkció egyben nagyon hasonlít a fentebb leírt GPCR rendszerhez, ugyanis a cAMP-PKA és MAPK jelút itt is fontos szerepet tölt be a jelátvitelben. A jelátvitelt a külső környezetben lévő ammónium ionok indítják be, akkor mikor a szállítási folyamat bekövetkezik (Bahn és mtsai, 2007). *S. cerevisiae*-nél a Mep2 mutációja a pszeudohifa képzés eliminációját okozza, ami megerősíti azt a tényt, hogy a transzportot és az érzékelést követő jelátvitelt az ammónium ionok jelenléte indítja be

(Bahn és mtsai, 2007). *C. albicans*-nál érdekes módon a hifás átváltás előidézője az, hogy a Mep2-n nem történik NH_4^+ - transzport. Kísérleti eredmények szerint a Mep2 ilyenkor van aktív formában, ami a hifázásért felelős jelátvitelt bekapcsolja (Bahn és mtsai, 2007).

Az aminosavak érzékelésére szintén specializált receptorális rendszerrel történik. *S.cerevisiae*-ben az Ssy1-Ptr3-Ssy5 gének felelősek a szignalizációért, melyek az extra- és intracelluláris aminosavakat képesek érzékelni (Liu és mtsai, 2008). Az Ssy1 egy membrán protein kettős funkcióval (érezékelés és transzport) és ehhez fizikailag kapcsolódik a Ptr3-Ssy5 (Liu és mtsai, 2008). Aminosav kötődése során az Ssy1 aktiválja az Ssy5 proteázt, mely aktivál két transzkripciós faktort, melyet követően aminosav permeázok és aminosav metabolizmusért felelős gének expressziója indul meg (Bahn és mtsai, 2007). A *C. albicans* aminosav szenzor rendszere hasonló a fentebb leírtakhoz, annyi különbséggel, hogy itt a Gpr1 (GPCR) is képes a fentiekhez hasonló funkciót betölteni. Ebben az esetben a Gpr1 képes a metionint érzékelni, és indukálni az élesztő-hifa átváltást (Maidan és mtsai, 2005). A rendszer bonyolultságát mutatja, hogy a nitrogénforrás érzékelése és az általa indukált szignáltranszdukciós útvonalak működtetése mellett, más útvonalakra is figyelnie kell a sejtnek. Például a *S. cerevisiae* preferált nitrogénforrás jelenlétében egy úgynevezett nitrogén katabolikus represszióval (NCR) gátolja azon gének kifejeződését, melyek az alternatív nitrogén tartalmú tápanyag (GABA, prolin) felvételét lehetővé teszik (Conrad és mtsai, 2014).

Szén-dioxid érzékelés

A dimorfizmus jelenségének magyarázata, valamint a jelenség leírása Pasteur nevéhez köthető, aki bebizonyította, hogy az O_2 jelenlétében fonalas

Mucor racemosus CO₂ – légkörben unicelluláris növekedésbe váltott át (Ruiz-Herrera, 2012). Ez volt az első megfigyelés, mely egy külső környezeti körülményre adott válaszreakciót vizsgált.

A CO₂ egy apoláris molekula, mely az egyik legfontosabb gáz az élő organizmusok számára, ami lehet egyben légzési melléktermék vagy tápanyag is. Mindezek mellett a CO₂ egy szignalizációs molekula, mely jelentősen befolyásolja a patogén gombák növekedését, hiszen amikor a patogén gombák bekerülnek a szervezetbe a külső körülményekhez képest jelentős CO₂ – koncentrációnövekedéssel kell szembenéznük. A levegő 0,036%-os CO₂ szintjéhez képest egy gazdaszervezetben 5%-ra is emelkedhet a koncentráció. Ha a *C. albicans* és *C. neoformans* esetét vesszük, a szén-dioxid emelkedett koncentrációja elősegíti a kapszulaképződést és a hifás átváltást, amelyek e két patogénnek fő virulencia faktora (Calderone és Fonzi, 2001, Li és Mody, 2010). *Candida albicans*-on végzett kísérletek igazolják, hogy 5%-os CO₂-szint indukálta a hifás átváltást illetve az agar inváziót (Bahn és Mühlshlegel, 2006).

A szén-dioxid kémiai érzékelése a szénsav anhidráz enzim segítségével történik, amely a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ reakciót katalizálja. Ez az enzim egyaránt fontos szerepet játszik a pH egyensúly fenntartásában, a légzésben (Hamburger shift) és bioszintetikus útvonalakban (Elleuche és Pöggeler, 2010). Ennek az enzimnek több osztálya van: az α főleg emlősökben és prokariótákban található meg, míg a β , az emlősök kivételével minden élőlényben (Elleuche és Pöggeler, 2010). A gombáknál elsőként a *S. cerevisiae*-ben írták le ezt az enzimet Nce103 névvel, amit a patogén gombákban is azonosítottak. *C. albicans* Nce103, míg a *C. neoformans* két β szénsav anhidrázát a Can1 és Can2 névvel látták el (Mogensen és mtsai, 2006; Innocenti és mtsai, 2010). A szénsav anhidráz *nce103* deléciója *S. cerevisiae*-ben letálisnak bizonyult, ugyanis a gomba képtelen volt a

normál környezeti körülmények között növekedni. Ellenben a magas széndioxid (5%) koncentráció képes volt komplementálni ezt a fenotípust, amit így HCR (high CO₂ response) törzsnek nevezték el (Elleuche és Pöggeler, 2010). A delécio következtében a *C. neoformans* és *C. albicans* mutánsok is mutatták ezt a HCR fenotípust, viszont kísérletek azt bizonyították, hogy ez *in vivo* nem jár avirulenciával (Elleuche és Pöggeler, 2010). Ellenben a humán epitheliális modell rendszerben (ahol a széndioxid szintje alacsonyabb a gazdaszervezethez képest) az *nce103Δ C. albicans* mutáns törzs nem tudott léziót okozni (Bahn és Mühlchlegel, 2006; Elleuche és Pöggeler, 2010).

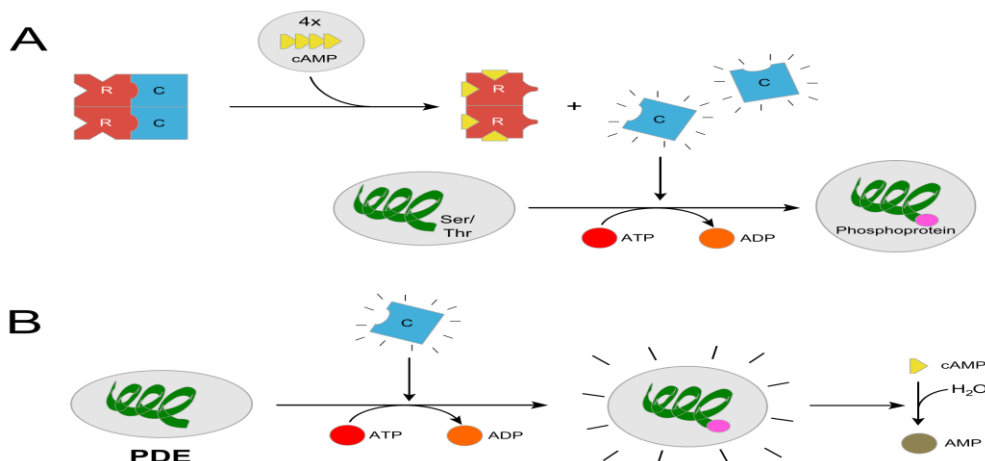
Az eddigiek alapján látható, hogy a morfológiai átváltás nem csak egy fenotípusos változás, hanem bonyolult jelzés-válasz reakciók összessége. A fázisváltással egyidejűleg vagy hifa vagy élesztő állapotra specifikus gének aktiválódnak, melyek a megváltozott körülményekhez való alkalmazkodást, így a túlélést segítik. Fontos azt is kiemelni, hogy a főbb környezeti faktorok külön-külön is képesek a morfológiai átváltást indukálni. Ahhoz, hogy például a hőmérséklet hifázást váltson ki, szükséges az összehangolt, az élesztő és hifa állapotban kifejeződő gének precíz szabályozása, melyet a jelátviteli kaszkádok hivatottak kivitelezni.

II.3 Környezet érzékelés integrált útvonala: cAMP-PKA és MAPK jelátvitel

A fentebb összefoglalt főbb környezeti tényezők jelátviteli folyamataért két, az eukarióták között meglehetősen konzervált útvonal felel. **A protein kináz A (PKA)** és a **mitogén aktivált protein kináz (MAPK)** olyan enzimek, melyek a fehérjék oldalláncán lévő szerin, threonin, hisztidin vagy tirozin aminosavakat foszforilálják, ezzel szabályozva a fehérjék

aktivitását. A gombáktól az emberig általánosan elmondható, hogy a PKA és MAPK útvonal egymással kommunikáló jelpálya rendszerek, és mindkét szignalizáció esszenciális az optimális sejtműködéshez (Sengupta és mtsai, 2007). E tények fényében nem tudunk kizárólagosan PKA vagy MAPK hatásról beszélni, ugyanis ezek együttesen felelnek a sejtek környezethez történő finom hangolásáért (Gerits és mtsai, 2008). A PKA és MAPK út a dimorf gombák esetében a fonalas növekedéshez, és az ozmotikus stressz válaszhoz szükséges (Roberts és mtsai, 1994; Mayorga és mtsai, 1999; Alonso-Monge és mtsai, 2003). A két jelátviteli mechanizmus közül itt a cAMP-függő PKA útról, és ennek a gombák dimorfizmusában és virulenciájában betöltött szerepéről lesz szó.

A cAMP függő Protein kináz A (PKA) mediált szignalizáció egy a gombák dimorfizmus regulációjában központi szerepet betöltő jelpálya. A protein kináz A egy heterotetramer enzim, mely képes a fehérjék szerin és treonin oldalláncait foszforilálni, ezzel aktiválni az adott fehérjét (Fuller és Rhodes, 2012). A PKA fehérje egy regulációs fehérje által kötve van, mely megakadályozza az enzim „akaratlan” működését. (3. ábra) Univerzálisan leírható, hogy valamely külső környezeti tényező hatására, a másodlagos hírvivő cAMP keletkezik, mely hozzákötődik a PKA-t gátló szabályzó fehérjéhez, ami így konformáció változáson átesve, lekapcsolódik az enzimről. (3. ábra) Ez a PKA aktivációs kaszkádfolyamata. A jelátvitel szabályozása történhet a cAMP-t szintetizáló adenilát cikláz enzim oldaláról, illetve a már megszintetizált cAMP lebontását katalizáló foszfodiészteráz részéről (Fuller és Rhodes, 2012).



3. ábra A protein kináz A aktivációs mechanizmusa. **A)** a cAMP kötődése a regulációs alegységhez [R], melynek következtében aktiválódik az enzim katalitikus része [C]. **B)** Az útvonal inaktivációs mechanizmusa, mely során az aktivált foszfo-diészteráz [PDE] a cAMP-t hidrolizálja. [5]

A kaszkádot már viszonylag részletesen ismerik *S.cerevisiae*-ben, viszont szükséges megemlíteni néhány fontosabb jellemzőjét, és különbségét a patogén gombákhoz képest. A *S.cerevisiae* cAMP-PKA útvonala elsősorban a tápanyag jelenlétének érzékelésére specializálódott, ahol az adenilát cikláz enzimet közvetetten a glükóz jelenléte aktiválja. A cAMP szint emelkedésével a PKA enzim aktiválódik, melynek katalitikus alegységét 3 gén is kódolja e fajban (Tpk1, Tpk2, Tpk3) (Thevelein és mtsai, 1999; Haesendonckx és mtsai, 2012). A PKA mRNS szintjének csökkenése az energia felhasználást főleg az asszimilációra irányítja át. Fontos, hogy a glükóz mellett a nitrogén forrás jelenléte, vagy hiánya cAMP independens módon képes aktiválni a PKA-t. Ez a jel a pszeudohifás növekedést szabályozza, ami elősegíti a limitáló tápanyag megszerzését (Tamaki, 2007; Fuller és Rhodes, 2012). Ezen útvonal konzervativizmusára utal, hogy a távoli rokon és dimorfizmust nem mutató *Schizosaccharomyces pombe*

hasadó élesztő protein kináz A jelátvittele hasonló a *S.cerevisiae*-hez, ugyanis a glükóz érzékelésben tölt be fontos szerepet. A glükóz hatására képződött cAMP jel aktiválja a PKA enzimet, mely represszálja a szexuális ciklusát és a glükoneogenezis enzimeit, mint például az *fbp1* fruktóz-1-6 biszfoszfátáz enzimet (Hoffman, 2005).

Mivel a patogén gombák életben maradásának kulcsa a gazdaszervezethez történő adaptációban rejlik, emiatt jelfeldolgozó rendszerük kifinomultabb, és nagyobb felbontással rendelkezik a fentebb említett két fajhoz képest. A patogén gombákban a PKA szabályozza a morfogenezist: *C. albicans*-ban és *U.maydis*-ban az élesztő-hifa átváltásért felel, *C. neoformans*-nál a titán sejtfal formálódásért, valamint számos penész esetében leírták, hogy a spórák csirázásában fontos szerepet tölt be (Sonneborn és mtsai, 2000; Schumacher és mtsai, 2008; Mehrabi, 2009; Kronstad és mtsai, 2011).

A *Candida albicans* patogenitásához szükséges a morfológiai átváltás. Számára ez biztosítja az immunrendszer kikerülését, és a szövetek invázióját. A cAMP-PKA út pozitívan regulálja a dimorf átváltást, az *efg1* és *flo8* transzkripciós faktorokon keresztül. Ha az útvonal bármely eleme megsérül, az az átváltás eliminálódását vonja maga után, ami csökkent virulenciát eredményez *in vivo* (Hogan és Sundstorm, 2009). A *C. albicans*-nak ellentétben az *S. cerevisiae*-vel, két PKA izoformája van, a Tpk1 és Tpk2, melyek az élesztőhöz hasonlóan eltérő módon befolyásolják a morfológiai átváltást (Hogan és Sundstorm, 2009). Érdekesség például, hogy a *C. albicans* GPCR rendszere, ellentétben a *S. cerevisiae*-vel, az aminosavak jelenlétét érzékelve képes a jelátviteli folyamatokat beindítani (Fuller és Rhodes, 2012). Az eltérő élettér miatt a *C. albicans* PKA útvonalát egyéb faktorok is aktiválhatják. Ilyenek például a muramil dipeptidek, melyek a

baktériumok sejt falából származnak, vagy az N-acetil glükózamin, melyek képesek az adenilát ciklázt aktiválni. Úgy tűnik, hogy a hifás átváltást befolyásoló főbb környezeti körülmények HSP90 dajkafehérje segítségével (ezen keresztül) képes csak fonalas növekedést előidézni (Hogan és Sundstorm, 2009; Fuller és Rhodes 2012).

A növénypatogén *Magnaporthe grisea* a rizs egyik veszedelmes kártevője. Képes appresszóriumokat formálni, melyek segítségével fizikailag képes áttörni a növény kutikuláját és sejt falát, minek következtében lehetőség nyílik a környező szövetek inváziójára. A cAMP-PKA út fontos szerepet tölt be az apresszórium kialakításában, ugyanis a gomba egy receptor segítségével képes érzékelni a növény hidrofób felszínét, és ez a közvetlen kontaktus indítja be az apresszórium formálást (Mehrabi, 2009). Kísérletek során a jelpálya tagjai közül a G-protein α alegység kiütésekor a patogén képtelen volt apresszóriumot formálni, és csak akkor tudta a növényt fertőzni, ha mesterséges sérülést idéztek elő (Mehrabi, 2009).

A *C. neoformans* a legyengült immunrendszerű szervezetekben meningoencephalitist okozó bazidiumos patogén gomba. A *C. neoformans* egy érdekes tulajdonsága, hogy képes ún. titán sejt létrehozására, ami egy vastag poliszaccharid kapszula szintézisét jelenti. A protein kináz A jelátvitel elősegíti a titán sejt formálódását, mely rezisztenssé teszi a sejteket a makrofágok általi fagocitózisra (Crabtree és mtsai, 2012). A PKA továbbá regulálja az élőlényre jellemző pigment anyag szintézisét is, mely a gazdaszervezet által generált oxidatív stressz ellen védi a sejtet (Fuller és Rhodes, 2012). Fontos megemlíteni, hogy a PKA regulációs alegység hiánya nagyobb méretű kapszulát eredményez, mely így *in vivo* hipervirulenciával jár (Kozubowski és mtsai, 2009).

A cAMP-PKA jelátvitel humán vonatkozása más szempontból is nagyon jelentős, ugyanis az itt bekövetkezett változás számos daganatos

megbetegedés okozója is lehet (Yu és mtsai, 2012; Berthon és mtsai, 2015). A Lauren féle gyomorrákok esetében megfigyelték, hogy az adenilát cikláz enzim emelkedett szintet mutatott, ami ennek következtében magas cAMP szintet is eredményezett. Ez a cAMP-PKA út magasabb aktivitásával járt, mely bizonyos fehérjék foszforilálásával kifejezetten elősegítette a tumor metasztázisát (Hong és mtsai, 2013). Ez azonban nem mondható univerzálisnak. Például az előbbivel ellentétben a húgyhólyagból származó daganatos sejtek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy a cAMP szint emelése csökkenti a sejtek invázióját és a sejt osztódást (Ou és mtsai, 2014).

II.4 Egyéb környezeti faktorok

Quorum sensing

A quorum sensing (QS) a sejtűrűség által létrejövő génexpressziós reguláció. A QS során a sejtek kémiai jelzőanyagokat termelnek, melyek koncentrációja a sejtszámmal nő. Ezek az ún. autoinducer molekulák, melyek sokrétű funkciót aktiválhatnak a sejtekben. Baktériumok esetében például, konjugációt, kompetenciát, vagy biofilm képzést, míg gombák esetében a morfogenezist és a dimorf átváltást szabályozzák (Miller és Bassler, 2001; Albuquerque és Casadevall, 2012). Emellett az egyik ilyen anyagról, a farnezoáról megállapították, hogy rivális gombákkal szembeni védekezésben is szerepet játszik, dimorfizmus gátlásával és apoptózis indukciójával (Nickerson és mtsai, 2006). A már tárgyalt patogén gombák közül a *C. albicans* is termeli ezt az anyagot. Ez egy hidrofób sesquiterpén alkohol, mely képes a *C. albicans* biofilm képzését és élesztő-hifa átváltását szabályozni (Ramage és mtsai, 2002). A farnezol lipofil természete miatt képes átoldódni a lipid kettős rétegen, mely a sejtbe kerülve az adenilát cikláz (Cyr1) enzimhez kötődik, mely így a cAMP szintézist gátolja. Ennek

következtében a protein kinázA (Tpk1/2) blokkolva marad a regulációs alegység által, így a hifás megnyúlás elmarad (Lindsay és mtsai, 2012). Tulajdonképpen a farneazol így a sejteket élesztő formában képes tartani. Érdekes jelenség, hogy létezik egy idő korlát, míg a sejtek reagálnak a farneazolra. A hifás indukció után 2 órával adott farneazol már nem tudta gátolni a fonalas növekedést, viszont a hifás átváltás után 24 órával a sejtek ismét képesek voltak érzékenyekké válni a farneazolra (Nickerson és mtsai, 2006). Ez az úgynevezett elköteleződés, ami tulajdonképpen időfüggő, melynek váltakozása felel az érett, vastag biofilm kialakulásáért.

A biofilm élesztő állapotú és hifás sejtek szövetéke, mely védelmet nyújt a sejtek számára például az antimikotikumokkal szemben (Bouza, 2014). De kísérletesen megállapították, hogy farnezollal kezelt *C. albicans* sejtek, hidrogén-peroxid és ozmotikus stressz rezisztanciája is szignifikánsan növekedett (Deveau és mtsai, 2010). Patkányokon végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy azok az egyedek hamarabb elpusztultak, akiket farnezollal előkezelt *C. albicans*-sejtekkel fertőztek, ugyanis ezek a sejtek rezisztensebbek voltak az immunrendszer oxidatív stressz válaszával szemben (Nickerson és mtsai, 2006). A farneazol mellett találtak más QS molekulát is, melyek jelenléte szintén elősegítette a hifás átalakulást. Ilyen volt például a tirozol (Chen és mtsai, 2004).

II.5 A hasadó élesztők, mint modellszervezetek

Doktori tanulmányaim során az élesztők dimorfizmusának genetikai vizsgálatával foglalkoztam. Ehhez a *Schizosaccharomyces japonicus* fajt használtam modellszervezetként. (4. ábra)



4. ábra: A *Schizosaccharomyces japonicus* vad típusú sejtjei. Az ábrán a 7-1 törzskönyvi számú törzs látható. A sejtek YPA táptalajon 30°C-on 1 napig inkubálódtak.

Ez a faj a hasadó élesztők közé tartozik, s közeli rokona az *Schizosaccharomyces pombe*-nek. Mindkét faj sejtjei eukarióta sejtfelépítésűek, nagy előnyük más élesztőkhöz képest, hogy genetikai állományuk haploid, így a létrehozott mutáció azonnal megnyilvánulhat fenotípusosan. Ráadásul, a teljes genetikai állományuk szekvenciája ismert.[6]

Wood és mtsai. 2002-ben a *Sch. pombe* teljes genom szekvenciáját annotálták. Érdekességképpen megemlíthető, hogy az emberi genommal történő bioinformatikai összehasonlítások alapján 289 hasadó élesztő gént találtak, melyek homológjai az emberben különféle betegség kialakulásáért felelősek. Ezek közül 23 gén az emberi daganatos megbetegedéssel hozható összefüggésbe, így megerősítve azt, hogy a hasadó élesztők alkalmas modellszervezetek az összetettebb eukarióta sejtek és sejt folyamatok tanulmányozására (Wixon, 2002; Wood és mtsai, 2002).

További előny, hogy egyszerűen tenyészthetőek és nem patogének. A *Sch. pombe*-re kidolgozott molekuláris biológiai módszerek évtizedek óta rendelkezésre állnak, melyek nagy része a *Sch. japonicus*-ra is alkalmazható.

Jól kidolgozott protokollok segítségével a laboratóriumi munka kényelmes és egyszerű velük. [8]

II.6. *Sch. japonicus* jellemzői

A *Sch. japonicus* hasadó élesztőt 1928-ban Japánban izolálták eperről. Ez a *Schizosaccharomyces* genusz filogenetikailag legidősebb tagja (Sipiczki, 1995). Ezen hasadó élesztő, eltérően a genusz többi tagjától, dimorfizmust mutat, vagyis képes egysejtes élesztő formából fonalas növekedési formába váltani (Sipiczki, 1998a). Ráadásul egyaránt képes valódi- és pszeudohifát is létrehozni, amit feltehetően a tápanyagok kimerülése és azok hiánya okoz (Sipiczki, 1998a).

Mivel bioinformatikai összehasonlítások alapján, a dimorfizmusért felelős gének egy része evolúciósan konzervatív, azaz nagy hasonlóságot mutatnak a különböző fajok hasonló génjeivel (Pan és Heitman, 1999; Nadal és mtsai, 2008), más gének pedig fajspecifikusak, így a dimorfizmus genetikai hátterének tanulmányozására érdemes több fajt is megvizsgálni. Hiszen ezzel fel lehet tární a morfológiai átváltás fajtól független, evolúciósan konzerválódott génjeit és útvonalait, de a fajspecifikus jellemzőit is.

Ezért tanszékünkön már korábban elkezdtek a *Sch. japonicus* dimorfizmusának kutatását. Ennek során kiderítettük, hogy a környezeti körülmények hatással vannak a hifaképzésére. A korábbi eredmények azt mutatták, hogy feltehetően a tápanyagok hiánya indukálja a morfológiai átváltást, mely folyamat szabályozásában a cAMP szintnek is fontos szerepe van. (Sipiczki és mtsai, 1998 a,b)

III. Anyagok és módszerek

III.1 Felhasznált törzsek (1. táblázat)

1. táblázat: A kísérleteink során felhasznált *Sch. japonicus* törzsek

Törzskönyvi szám	Genotípus	Forrás
7-1 CCY-44-5-1 (CBS 354)	vad típus	Yukawa és Maki, 1931
Tr-150	<i>pka1Δ::KanMX6</i>	Ebben a tanulmányban készített törzs

III.2 Felhasznált táptalajok: (2-6. táblázat)

2. táblázat: Komplet táfolyadékok *Sch. japonicus* tenyésztésére:

YEL (100ml)	YPL (100ml)	YPL+1M szorbitol (100ml)
1g élesztő kivonat (Scharlau, 07-079-500) 3g D-glükóz (VWR) pH:5,2	1g élesztő kivonat (Scharlau) 1g kazein pepton (Scharlau) 3g D-glükóz (VWR) pH:5,2	YPL+ 18,217 g szorbitol
YEA (100ml)	YPA (100ml)	YPA+1M szorbitol (100ml)
YEL + 2 g por agar	YPL+ 2 g por agar	YPL+ 18,217g szorbitol + 2 g por agar

3. táblázat: Minimál táfolyadékok *Sch. japonicus* tenyésztésére:

EMML (100ml)	SML
0,3 g kálium-hidrogén-ftalát (VWR) 0,22 g Na ₂ HPO ₄ 0,5 g NH ₄ Cl 2 g D-glükóz 2 ml sóoldat (50x) 0,1ml vitamin oldat (1000x) 0,01ml nyomelem oldat (10000x) pH:6,3	0,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1g KH ₂ PO ₄ 1g D-glükóz 0,05 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,1 ml vitamin oldat (sárga) pH: 6,5

4. táblázat: Antibiotikum tartalmú komplett táptalajok *Sch. japonicus* szelekcióhoz

Táptalaj	Geneticin törzsolgat koncentráció	YPA/YEA - hoz szükséges geneticin
YPA + geneticin (G418)	100 mg/ml	100 ml szelektív YPA táptalajhoz: 400µl G418 (400µg/ml)
YEA + geneticin (G418)	100 mg/ml	100 ml szelektív YEA táptalajhoz: 400µl G418 (400µg/ml)

5. táblázat: Minimál táptalajok kiegészítései

50x sóoldat	1000x vitamin oldat	10000x nyomelem oldat
52,5 g/l MgCl ₂ x 6H ₂ O	1 g/l pantotén sav	5 g/l borsav
0,735g/l CaCl ₂ x 7H ₂ O	10 g/l nikotin sav	4 g/l MnSO ₄
50 g/l KCl	10 g/l inozitol	4 g/l ZnSO ₄ x 7H ₂ O
2 g/l Na ₂ SO ₄	10 mg/l biotin	2 g/l FeCl ₂ x 6H ₂ O
		0,4 g/l MoO ₃ x 1H ₂ O
		1 g/l KI
		0,4 g/l CuSO ₄ x 5H ₂ O
		10 g/l citromsav

6. táblázat: Táptalajok *E.coli* tenyésztésére

LB (100ml)	LBA (100ml)	LB+ampicillin
0,5 g élesztő kivonat (Scharlau, 07-079-500) 1g tripton (Scharlau, 07-119) 1 g NaCl (VWR) pH: 7,0	LB +2 g por agar	kiegészítés szelektív táptalajhoz: 100 ml LB/LBA + 100 µl ampicillin (50µg/ml)

III.3. Klasszikus módszerek

A dimorf átváltást befolyásoló faktorok hatását párhuzamos és független kísérletekkel egyaránt teszteltük. Csak akkor tekintettünk egy faktort a dimorfizmus meghatározó tényezőjének, ha egy adott kísérletben 3 vagy ennél több alkalommal megfigyelhető volt a hatás.

III.3.1 Az élesztő-hifa átváltás vizsgálata

A *Sch. japonicus* hifázását befolyásoló körülményeket YPA, YEA és EMMA táptalajon vizsgáltuk. A vizsgálat során a petri csészébe öntött agar közepére, kacs segítségével 7-1 törzskönyvi számú sejteket oltottunk, majd 25°C, 30°C valamint 37°C-os inkubátorba helyeztük a csészéket, melyeket 1 hétig inkubáltunk. A továbbiakban minden csészés kísérletnél ezt a módszert követtük. A reprodukálhatóságot 10 ismétléssel megerősítettük. A kiértékelés során figyelembe vettük a hifák elindulásának megjelenési időpontját, a hifák méretét, és az adott csík mentén ún. hifás kiindulási gócok számát.

III.3.2 Az adenin és guanin hatása az élesztő-hifa átváltásra

Készítettünk olyan YEA, YPA és EMMA táptalajokat, melyeket 0,5-2 mg/ml koncentrációjú adeninnel valamint guaninnal egészítettünk ki. A guanin esetében szükséges volt a pH-t NaOH-dal bázikus irányba eltolni, ugyanis a semleges pH-n kolloid állapotban volt jelen. A csészéket 14 napig inkubáltuk 30°C-on, majd megvizsgáltuk a telepek morfológiáját valamint mikroszkóppal a sejtek fenotípusát. Az eredményt, három különböző időpontban ismételt méréssel megerősítettük.

III.3.3 Vas (II) és Vas (III) ionok hatása az élesztő-hifa átváltásra

Szakirodalmi adatok alapján a dimorf gombák hifa képzését indukálják bizonyos fémionok, különösen a vas ionok jelenléte. 2,5; 5 és 10mM-os koncentrációban FeCl₂ és FeCl₃-os YEA és YPA táptalajokat készítettünk, hogy megvizsgáljuk az *Sch. japonicus* dimorfizmusára kifejtett hatását. A csészéket a már megszokott módon 7 napig 30°C-on inkubáltuk. A vizsgálat során ezek az eredmények három párhuzamos méréssel lettek leellenőrizve.

III.3.4 Glükóz, élesztő kivonat, pepton és agar koncentráció hatása az élesztő-hifa átváltásra

E kísérlet során olyan YEA és YPA táptalajokat alkalmaztunk, melyekben külön-külön megváltoztattuk az alkotóelemek koncentrációját. Készítettünk 0,5%; 1%; 3%; 5% és 10%(m/v)-os glükóz tartalmú táptalajokat. Az élesztő kivonat koncentrációját 0,5% 1% valamint 2% és 3% (m/v)-ban alkalmaztuk. Olyan YPA táptalajt is készítettünk, melynek a pepton koncentrációját emeltük 2- illetve 3% (m/v)-ra. Végezetül az agar koncentrációt is változtattuk, 1% 2%; 5% és 8%(m/v)-os táptalajokat készítettünk. A kísérletet 6 párhuzamos vizsgálattal támasztottuk alá.

III.3.5 Aminosavak, vitaminok és nyomelemek hatása az élesztő-hifa átváltásra

Az aminosavak, vitaminok, nyomelemek hatását megvizsgáltuk YPA, EMMA táptalajokon, úgy, hogy azokat kiegészítettük külön-külön a vizsgálandó anyaggal. Ezentúl megvizsgáltuk azt is, hogy a sejtek képesek-e

az egyes aminosavakat nitrogén forrásként hasznosítani. Ekkor az EMMA táptalajból kihagyva az ammónium-kloridot, különböző aminosavakkal helyettesítettük a nitrogénforrást. A leucin, prolin, arginin, metionin, valin, izo-leucin, triptofán aminosavakat 10mM koncentrációban alkalmaztuk.

A vitamin oldat összetételét nem változtattuk meg, csupán a mennyiségét növeltük meg kétszeresére, háromszorosára.

A nyomelem koncentrációt hasonlóan a vitaminéhoz, két illetve háromszoros mennyiségben alkalmaztuk. Minden változtatás csak külön-külön volt tesztelve, a három faktort egyszerre nem változtattuk. A csészéket 30°C-on inkubáltuk 7 napig. Ezeket a kísérleteket 4 különböző időpontban megismételtük.

III.3.6 Stressz vizsgálat

A kálium-klorid stressz vizsgálat során YPA táptalajhoz 0,75 illetve 1M-os végkoncentrációban adtunk KCl-ot. A vizsgálni kívánt (7-1 és *pka1* mutáns) sejtek kiindulási koncentrációját $OD_{595}=0,2$ -re állítottuk, majd ezekből 10x, 100x és 1000x hígítást készítettünk, melyekből egyenként - a KCl-os YPA táptalajokra - 40-40 μ l-t csepegtettünk. A csészéket 30°C-on inkubáltuk 2 napig.

A magas glükóz koncentráció ozmotikus stressz hatását 20, 30 és 40%(m/v) glükóz tartalmú YPA-n teszteltük. A 7-1 és *pka1* mutáns sejtekből sejtuszpenziót készítettünk, majd a sejtek kiindulási koncentrációját $OD_{595}=0,2$ -re állítottuk, és ezekből 10x, 100x és 1000x hígítást készítettünk. Minden sejt koncentrációból a csészékre 40 μ l-t csepegtettünk, majd ezeket 30°C-on inkubáltuk 2 napig.

A koffein sejtekre gyakorolt hatásvizsgálatát olyan YPA táptalajokon teszteltük, melyek koffein végkoncentrációja 5 és 7mM volt. Ezekre a

csészékre a 7-1 és *pka1* mutáns sejtekből készített, $OD_{595}=0,2$ koncentrációjú sejt szuszpenzióból 10x, 100x és 1000x higításban cseppentettünk 40-40 μ l-t. A csészéket 30°C-on inkubáltuk 2 napig.

A H₂O₂ stressz vizsgálatához 150-150 ml YPL tápfolyadékba oltottunk 7-1 és *pka1* mutáns sejteket, melyeket egy éjszakán át 30°C-on rázatva inkubáltunk. Az inkubálás után megmértük a sejtsűrűségeket, és mindkét tenyészet sűrűségét $OD_{595}=0,7$ -re állítottuk. Ezekből 50-50 ml-t 4000 rpm-en 2 percig centrifugáltunk, majd a felülúszót eltávolítva a sejteket ugyanezzel a fordulatszámmal háromszor mostuk MilliQ vízzel. A pelleteket 30 ml MilliQ vízben vettük fel, majd a sejtsuszpenziókat 10-10-10 ml-ként szétosztottuk Falcon csövekbe. Ezekhez a csövekhez adtunk a 30%-os H₂O₂-ot úgy, hogy a végkoncentráció egyenként 5, 20, és 40mM legyen. Az így elkészített hidrogén-peroxid tartalmú sejtsuszpenziókat 30°C-on inkubáltuk 60 percig. Végezetül a csöveket centrifugáltuk 4000 rpm-en 2 percig, majd a pelletet kétszer mostuk MilliQ vízzel. Ezután a sejteket 10 ml MilliQ vízben vettük fel, majd ezekből cseppentettünk YPA csészére 40 μ l térfogatokat. A csészéket 30°C-on inkubáltuk 2 napig. Minden stressz vizsgálat három párhuzamos mérés eredménye.

III.3.7 FBS indukció

Komplett tápfolyadékhoz adott magzati borjú vérszérum (FBS)(Sigma F7524 500m, Lot:061M3395L) koncentrációt 1-50%-ig alkalmaztuk. Azért, hogy kizárjuk a tápfolyadék alkotóinak (cukor, élesztőkivonat, pepton) koncentrációjának csökkenéséből eredő esetleges téves pozitív eredményt, olyan YPL-t készítettünk, melynek minden alkotó eleme dupla mennyiségű volt. Így például 10%-os YPL+FBS tápfolyadék esetén 50ml dupla koncentrációjú YPL + 40ml Milli Q víz + 10ml FBS szérum-ot adtunk.

(összesen 100 ml 1x koncentráció a YPL-re nézve) Az inkubációt 25, 30, 37°C-on végeztük, rázatás nélkül 100ml-es Erlemeyer lombikban.

A szérum indukáló hatásának vizsgálatához YPL + szérum tartalmú tápfolyadékot forráspontig melegítettük, hogy a fehérjét kicsapjuk, majd szobahőmérsékletre hűtöttük a folyadékot, melybe egy oltókacsnyi sejtmenyiséget oltottunk. A szérummal végzett kísérleteket 3 párhuzamos vizsgálat valamint, különböző időpontokban háromszor ismételtük meg.

III.3.8 Élesztő vakuólum festés

A *Sch. japonicus* vakuólum festését a Molecular Probes Y-7531 kittel (ThermoScientific) végeztük. A protokoll alapján jártunk el: 10^6 sejt/ml koncentrációban centrifugáltunk le sejteket. Ezeket 50mM-os nátrium-citrát pH:5 és 2% glükóz tartalmú pufferben felfuszpendáltuk. 10mM-os karboxi-DCFDA-ból adtuk a sejtekhez a festékből, hogy a végkoncentráció $10\mu\text{M}$ -os legyen. Inkubáltuk a csöveket 15 percig 30°C-on. Majd fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus BX40) vizualizáltuk a vakuólumokat.

III. 3.9 Mikroszkópos mérések

A sejtek hosszának mérését Olympus BX40 fénymikroszkóppal végeztük. YPA táptalajról egy oltókacsnyi sejtmenyiséget 1,5ml MilliQ vízben szuszpendáltunk, majd a szuszpenzióból $10\mu\text{l}$ -t tárgylemezre cseppentettünk. A fénymikroszkópos mérés 100x-os objektívvel és mikrométer skálás okulárral történt.

III.3.10 pH hatása a hatása az élesztő-hifa átváltásra

A komplett táptalajok pH-ját (YEA, YPA) 37%-os HCl-val illetve 5M-koncentrációjú NaOH-dal állítottuk be a kívánt értékre. A vizsgálati intervallum pH4-től pH8-ig terjedt. pH4 alatti kísérletet nem végeztünk, ugyanis az agar ezen a körülményen már nem volt képes megszilárdulni. A bázikus pH felső határa pH9 volt, ugyanis ezen érték felett a sejtek elpusztultak. Az eredményt három párhuzamos mérés alapján értékeltük.

III.3.11 Szeptum festés

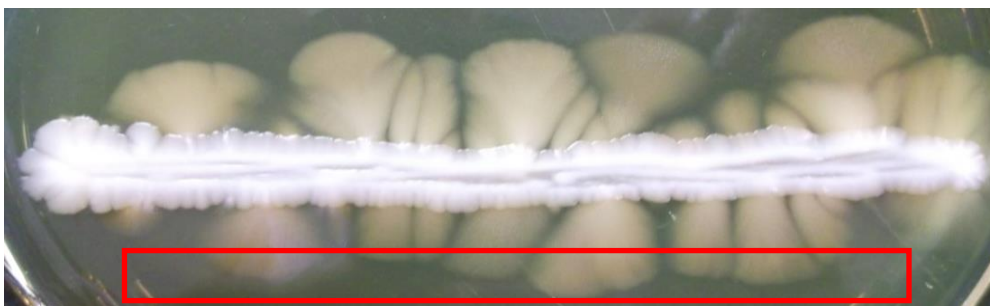
A Sigma-Aldrich F3543-1G (calcofluor) festékével vizualizáltuk a sejtek szeptumjait. Ebből 0,1mg/ml-es törzsoldatot készítettünk. Egy szilárd táptalajról egy kis kacsnyi sejtmenyiséget levettünk, és 15-20 μ l vízben felszuszpendáltunk. Ehhez adtunk a festékből úgy, hogy a festék végkoncentrációja 1 μ g/ml-legyen.

III.3.12 Hifa izolálása YPA szilárd táptalajból

Ahhoz, hogy meghatározzuk mely gének expresszálódnak a hifás állapotokban, RNS-t kellett izolálnunk a hifákból. Mivel külön indukáló anyag nélkül kialakult morfológiai átváltást akartunk vizsgálni, ezért szilárd táptalajból (YEA) kellett a hifákat izolálnunk. A probléma ezzel az volt, hogy az agart nem tudtuk feloldani kémiai, fizikai módszerrel úgy, hogy a hifák integritása ne sérüljön. Volt példa, hogy sikerült kioldani az agart, viszont ez az RNS-ek minőségét teljesen tönkretette. Megoldásunk az volt, hogy az agart 5%-os zselatinnal helyettesítettük. Ezután a petri csésze közepére élesztő csíkot húztunk, majd 1 hétig inkubáltuk a sejteket, melynek hatására

megjelentek a hifák. Mivel a hifák nagy része citoplazma nélküli, s inkább csak vakuóllummal van kitöltve, ezért az izolálásnál csak a csúcsi, citoplazmával telt körülbelül 3-4 mm vastagságú részt vágtuk ki a táptalajból az RNS izolálás céljára. (5. ábra)

A zselatinos hifa darabokat összegyűjtöttük egy steril petri csészébe, majd 37°C-os termosztátba raktuk. Ezen a hőmérsékleten a zselatin teljesen elfolyósodott, majd az így kapott folyadékot eppendorf csövekbe pipetázva átmostuk DEPC-es vízzel. Ezzel a lépéssel megszabadultunk a zselatintól, majd a hifák így készen álltak az RNS izolálás procedúrájára.



5. ábra RNS izolálásra használt hifacsúcsok

III.4 Molekuláris módszerek

III.4.1 Genomiális DNS izolálása *Sch. japonicus*-ból üvegyöngy segítségével

Vad típusú 7-1-es *Sch. japonicus*-t 150 ml YPL-be oltottunk, és 16-órát ráztattuk 30°C-on. A sejtenyészetet szétosztottuk 50ml-es Falcon csövekbe, majd centrifugáltuk 4°C-on, 4.000rpm-en 5 percig. A felülúszó eltávolítása után a pelletet kétszer mostuk MilliQ vízzel, eközben a sejteket átpipetáztuk 2ml-es Eppendorf csövekbe. A mosott sejtekhez 200µl lízis puffert adtunk (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH:8,0, 1mM EDTA pH:8,0) mellyel felfuszpendáltuk, majd ~200µl-nek

megfelelő üvegyöngyöt (425-600 μm) (Sigma G8772-10G)) és 200 μl fenol-kloroform-izoamil alkoholt (Sigma P2069-400ML) adtunk a szuszpenzióhoz. Ekkor egy sárgás-fehéres kicsapódás volt látható, amit vortexeltünk 10-15 másodpercig. Az így keletkezett homogén fehér színű oldatot centrifugáltuk 4°C-on 4.000 rpm-en 10 percig. A csövekben három fázis jelent meg, a legfelső vízdoldható fázis melyben a sejtek DNS-e is található, a középső fehér, változó vastagságú fázis, ami tömény kicsapódott fehérje, és az alsó, üvegyöngyöt, fenolt és sejttörmeléket tartalmazó fázis. A vizes fázist óvatosan leszívtuk a fehérje fázisról (~300-400 μl -t) majd új 2ml-es Eppendorf csövekbe raktuk át. Ezután a tisztább DNS érdekében még egyszer fenol-kloroformot adtunk a leszívott felső fázishoz. A centrifugálás után egy új, már tisztább felső fázist raktunk át 2ml-es Eppendorf csövekbe. Ezekhez 1-1 ml 100%-os etil-alkoholt (VWR) adtunk egyenként. Az alkohol hozzáadása után precipitációt tapasztaltunk, a pelyhek a kicsapódott DNS aggregátumok voltak. Ezt centrifugáltuk 10 percig 4°C-on, 10.000 rpm-en. A felülúszó eltávolítása után a pelletet (DNS+RNS) 100 μl RNáz-os 1xTE-ben (10mM TRIS-HCl, pH8; 1mM EDTA, 1mg/ml RNáz) vettük fel, melyeket 37°C-on inkubáltunk 30 percig. Ezután 0,1 térfogat (10 μl) 3M-os nátrium-acetátot és 2,5 térfogat (250 μl) 100%-os etil-alkoholt adtunk, majd a csöveket -20°C-on inkubáltuk 30 percig. Centrifugáltunk 10 percig 4°C-on 10.000 rpm-en, majd a felülúszót eltávolítottuk. A pelletet steril box alatt szárítottuk, hogy az alkohol teljesen elpárologjon. Ezután 100 μl 1xTE-vel feloldottuk a DNS-t, és ellenőriztük a tisztaságát nanodrop-al (Biosystems ACTGene UVS-99) A260/280= 1,7 és 1,8 tisztaságú, 2789 ng/ μl koncentrációjú DNS-t nyertünk ki ezzel a módszerrel.

III.4.2 A *pka1* mutáns készítéshez használt primerek és restrikciós endonukleázok (7. táblázat)

7. táblázat: PCR primerek és restrikciós enzimek.

Primer neve	Sorszám	Szekvencia (5'→3')	Leírás
SjPka1For	461	GGAGGTCGACGC AGCTATGA	A <i>Sch. japonicus pka1</i> teljes gén felszaporításához szükséges forward primer
SjPka1Rev	462	TACCCGCTATCTC AAACGC	A <i>Sch. japonicus pka1</i> teljes gén felszaporításához szükséges reverse primer
SjAflIIFor	-	TACTTAAGGTAA AACGACGGCCAG T	A teljes KanMX6 kazetta felszaporításához szükséges forward primer, az 5' végén AflII enzim felismerő hely + 3 bázis
SjKanRev	-	TTGTCCTCCTGGA AGGGTGTT	A teljes KanMX6 kazetta felszaporításához szükséges reverse primer
KanMX6For	201	TTGGACGAGTCG GAATCGCAG	A KanMX6 kazetta belső 987-1008 nukleotid pozíciójához kötődő forward ellenőrző primer
Kxtest	39	CCTGATTGCCCGA CATTATCGC	A KanMX6 kazetta belső 447-469 nukleotid pozíciójához kötődő reverse ellenőrző primer
SjPka1RDost	485	CAGCTTTGCGTAT CTGTAATGATGAT GG	A <i>Sch. japonicus pka1</i> géntől 1082 bp-al lentebb kötődő primer
Restr.enzimek	Tanszéki szám	Felismerő szekvencia	Tompa/ragadós vég
AflII (NEB)	-	CTTAAG	ragadós vég
KpnI (NEB)	-	GGTACC	ragadós vég

III.4.3 A *pka1* gén amplifikációja

PCR reakció a *pka1* gén amplifikációjára (8-9. táblázat):

A *pka1* gén felszaporításához alkalmazott PCR reakció Thermo Scientific Phusion magas hűségű polimerázzal történt. (AB 2720 Thermal Cycler)

8. táblázat: PCR reakció összetétele a *pka1* gén amplifikációjára

Összetevők	Térfogat (50 μ l végtérfogat esetén)
7-1 <i>Sch. japonicus</i> genomi DNS (2690ng/ μ l)	1 μ l
Phusion Polymerase puffer (F-530S)	10 μ l
Thermo Scientific dNTP mix 10mM (R0191)	3 μ l
SjPka1For primer (5x)	2 μ l
SjPka1Rev primer (5x)	2 μ l
Phusion DNA polymerase (F-530S)	0,5 μ l
MilliQ víz	31,5 μ l
	Összesen: 50μl

9. táblázat: A PCR program a *pka1* gén amplifikációjára

Hőmérséklet	idő
98°C	1 perc
98°C	30 másodperc
59°C	30 másodperc
72°C	50 másodperc
72°C	10 perc
10°C	∞

} 30x

III.4.4 A KanMX6 kazetta felszaporítása

Ezen szelekciós marker felszaporítása a 8. és 9. táblázatban leírt PCR protokoll módosításával történt, a pSJK101 plazmidról (10. táblázat). (Aoki és mtsai, 2010) Mivel a KanMX6 kazetta mérete (1357bp) kisebb, mint a *pkal* gén, ezért a szintézis időt 45 másodpercre állítottuk. (11. táblázat) Ebben az esetben a primerek 5' végére AflII és KpnI restriktív enzimek felismerő szekvenciáját terveztünk, melyek segítségével specifikussá tettük a ligálási reakciót.

10. táblázat: PCR reakció összetétele a KamX kazetta amplifikációjára

Összetevők	Térfogat (50µl végtérfogat esetén)
pSJK101 plazmid DNS (1978 ng/µl) (Furuya,2012)	1µl
Phusion Polymerase puffer (F-530S)	10µl
Thermo Scientific dNTP mix 10mM (R0191)	3µl
SjKanAflII primer (5x)	2µl
SjKanKpnI primer (5x)	2µl
Phusion DNA polymerase (F-530S)	0,5µl
MilliQ víz	31,5µl
	Összesen: 50µl

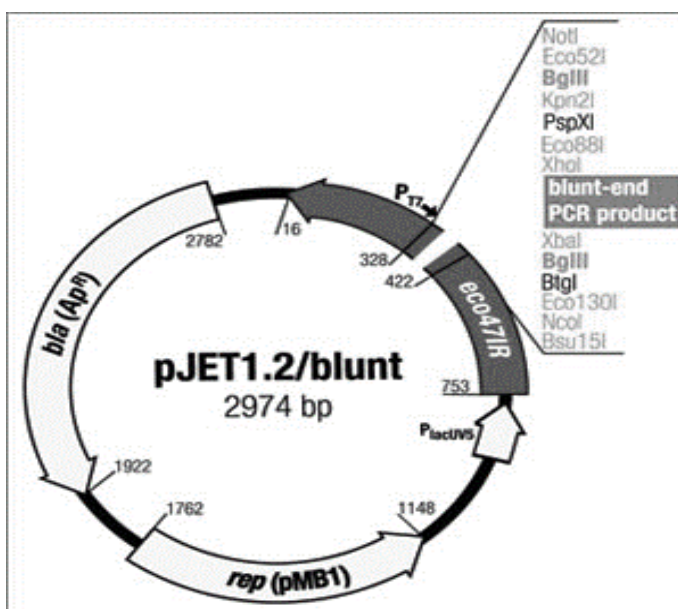
11. táblázat: A KanMX kazetta amplifikációjának PCR programja

Hőmérséklet	idő
98°C	1 perc
98°C	30 másodperc
69°C	30 másodperc
72°C	45 másodperc
72°C	10 perc
10°C	∞

} 30x

III.4.5 A felszaporított *pka1* klónozása pJET1.2/blunt vektorba (Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit, K1231)

A Thermo Scientific pJET1.2/blunt egy prokarióta klónozó vektor, melynek klónozó helyei egy restriktáz endonukleáz gén közepébe esnek. (6 ábra) Ha ez a vektor inzert nélkül ligálódik, akkor az átíródó DNS hasító enzim a baktérium halálát okozza.



6. ábra pJET1.2/blunt térképe a poliklónozó hellyel (Thermo Scientific)

A *pka1* PCR termékét közvetlenül tudtuk a vektorba ligálni, ugyanis a Phusion magas hűségű polimeráz tompa végeket generál. Ligáláskor a kit által javasolt protokoll követtük: (12. táblázat)

12. táblázat: Ligálás összetétele

Összetevők (K1231)	Térfogat
Reakció puffer 2X	10µl
PCR termék (tisztított, vagy nem tisztított)	1µl

pJET1.2/blunt vektor (50ng/μl)	1μl
Víz (nukleáz mentes)	7μl
T4 DNS ligáz	1μl
	Összesen: 20μl

A ligátumot 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten (22°C)

III.4.6 Baktérium transzformálás (Inoue és mtsai, 1990)

A ligátum (pJET1.2/blunt + *pka1*) 20μl-ét hozzáadtuk DH5α kompetens *E.coli* sejtekhez (D.M. Woodcock és mtsai, 1989). Jégen állni hagytuk a szuszpenziót 30 percig. Ezután 42°C-on hősokkot alkalmaztunk 2 percig. A lépést követően +600μl LB tápfolyadékot adtunk a sejtekhez, majd 37°C-os inkubáció következett 30 percig. Végezetül LBA+50μg/ml ampicillin tartalmú csészékre 150-150μl-t szélesztettünk. A csészéket 37°-on inkubáltuk 16 órát, majd az egyedülálló telepeket új LBA+ampicillin táptalajra oltottuk át.

III.4.7 Colony PCR

Ez a módszer az időigényes DNS izolálás helyett közvetlenül, a sejtekből a hőmérséklet hatására kiszabaduló DNS-t használja diagnosztikai célra. A baktérium telepekből 20μl vízzel, egy 1,5ml-es Eppendorf csőben szuszpenziót készítünk. (Itt fontos megemlíteni, hogy a baktériumok mennyisége az optimális PCR reakcióhoz a lehető legkisebb legyen.) A szuszpenziót 95°C-on (szárazblokkban) 5 percig inkubáljuk, majd a csöveket azonnal jégre helyezzük. Az így keletkezett lizátum felső vizes fázist, és egy

alsó sejttörmelék fázist tartalmaz. A PCR reakcióhoz a felső fázisból adunk 1-2 μ l-t. (13. táblázat)

13. táblázat: Colony PCR összetétele

Összetevők	Térfogat (50μl végtérfogat esetén)
sejtlizátum felső vizes fázisa	2 μ l
Dream Taq polimeráz puffer (EP0701)	5 μ l
Thermo Scientific dNTP mix 10mM (R0191)	3 μ l
pJET szekv.primer For (5x)	2 μ l
pJET szekv.primer Rev (5x)	2 μ l
Dream Taq polimeráz enzim (EP0701)	0,5 μ l
MilliQ víz	35,5 μ l
	Összesen 50μl

III.4.8 Plazmid izolálás baktériumból (Brinboim és Doly, 1979)

A *pka1* plazmid konstrukciót hordozó baktérium törzsből 200ml LB+ ampicillin tápfolyadékba oltottunk, majd 37°C-on rázatva 16 órát inkubáltuk. Az így keletkezett baktérium sejteket 10.000rpm-en, 4°C-on 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. A pellethez 5ml DISH I (50mM glükóz, 10mM EDTA, 25mM TRIS-HCl pH:8) oldatot adtunk, és óvatosan felszuszpendáltuk. Ezután 2 térfogat (10ml) DISH II (0,2N NaOH, 1% SDS) hozzáadásával egy erősen viszkózus oldat keletkezett, amit nagyon óvatos fel-le forgatással kevertünk össze, majd 10 percig jégen inkubáltuk. Végezetül 1,5 térfogat (7,5ml) DISH III (3M KOOC-CH₃, 11,5% ecetsav) oldatot adtunk a csövekhez, majd ugyancsak fel-le mozgatással kevertük az oldatot, melyet 10 percig jégen inkubáltunk. Centrifugáltuk a csöveget 5 percig 10.000 rpm 4°C-on, majd a tiszta felülúszót (20 ml) új csövekbe raktuk át. Ehhez adunk 0,6 térfogat (12ml) 2-propanolt, majd összekeverés

után 10.000 rpm-en 4°C-on 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk, majd a csöveket szárítottuk, hogy a 2-propanol maradéktalanul elpárologjon. A csövek alján található pallethez 3ml 1x TE oldatot + RNázt adtunk. Ezt inkubáltuk 37°C-on 30 percig (amíg a pellet teljesen fel nem oldódott), majd a 3ml-t szétosztottuk 2ml-es Eppendorf csövekbe. Ezekhez 1:1 arányban fenol: kloroform: izoamil alkohol-t (25:24:1) (Sigma P2069-400ML) adtunk, majd vortexeltük a mintákat 10 másodpercig. Centrifugálást kivitelezünk 10.000rpm-en 4°C-on 10 percig, majd a felső vizes fázist új 2ml-es Eppendorf csövekbe raktuk át. Ezekhez 0,5térfogát nátrium-acetátot és 2 térfogat 100%-os etil-alkoholt adtunk, összerázás után inkubáltuk a csöveket -20°C-on 30 percig. Végezetül a csöveket centrifugáltuk 10 percig 10000rpm-en 4°C-on, majd a felülúszót eltávolítottuk és a pelletet steril fülke alatt szárítottuk. A pellet mennyiségétől függően 150-300 µl 1xTE-ben vagy MilliQ vízben feloldottuk.

III.4.9 Restriktációs emésztés

A pJET1.2/blunt+*pka1* plazmidot és a KanMX6 PCR terméket egyaránt KpnI és AflII restikciós endonukleázokkal emésztettük (14. táblázat), ugyanis ez által a *pka1* gén nagy része eltávolítható.

14. táblázat: A restriktációs emésztés összetétele

Összetevők	Térfogat
pJET1.2/blunt+ <i>pka1</i> / KanMX6 PCR termék	2µl
NEB, AflII (R0520S)	1µl
NEB, KpnI (R0142S)	1µl
New England Biolabs, puffer 2	2µl
MilliQ víz	14µl
	összesen 20µl

A fentiek alapján összerakott oldatot 37°C-on inkubáltuk 3 órahosszat.

A pJET1.2/blunt+*pka1* plazmidból a két enzim 1168bp-t vágott ki, a maradék 3499bp-t kitisztítottuk, és a ligálási reakcióhoz ezt használtuk.

III.4.10 DNS agaróz gélből történő visszaizolálása

A fentebb említett restriktációs emésztés eredményeként keletkezett plazmid konstrukció DNS darabot (3499bp) és a *pka1* kódoló szakaszát (1168bp) agaróz gélen elválasztottuk. A nagyobb méretű (tömegű) sávot szikével UV fény alatt óvatosan körbevágtuk. Az UV besugárzást a lehető legrövidebb ideig végeztük, hogy elkerüljük a DNS károsodását. 1,5 ml-es Eppendorf csöveket kereszt irányban kettévágtuk, majd a csövek tetejét eldobtuk. A keletkezett fél-csővecskék alját tüvel kiszűrtük, majd félig töltöttük üvegyapottal. (Sigma-Aldrich, 18421-500G) A kivágott agaróz darabokat ráhelyeztük az így létrehozott üvegyapotos félcsővecskék tetejére, majd ezeket egy másik 1,5ml-es Eppendorf csőbe helyeztük. Ezután centrifugáltunk 10000 rpm-en szobahőmérsékleten 1 percig. Az üvegyapotos félcsővecskéket kidobtuk, majd a 1,5ml-es Eppendorfban összegyűlt folyadékot 0,1 térfogat nátrium-acetáttal és 2,5 térfogat etil-alkohollal kicsaptuk. Végül MilliQ vízben felvettük a mintákat, és nanodrop segítségével ellenőriztük a hozamot.

III.4.11 KanMX6 ligálása a pJET1.2/blunt+*pka1*szegélyi régiót tartalmazó plazmidba (15. táblázat)

15. táblázat: KanMX6 kazetta ligálása

Összetevők	Térfogat
pJET1.2/blunt+ <i>pka1</i> szegélyi régió 3499bp (24 ng/μl)	1μl
KanMX6 kazetta 1477bp (31ng/μl)	4μl

NEB, 10X T4 DNS ligáz puffer (M0202)	2µl
MilliQ víz	13µl
NEB, T4 DNS ligáz enzim (M0202)	1µl
	összesen 20µl

III.4.12 A *Sch. japonicus* integratív transzformálása elektroporátorral

(Aoki és mtsai, 2010)

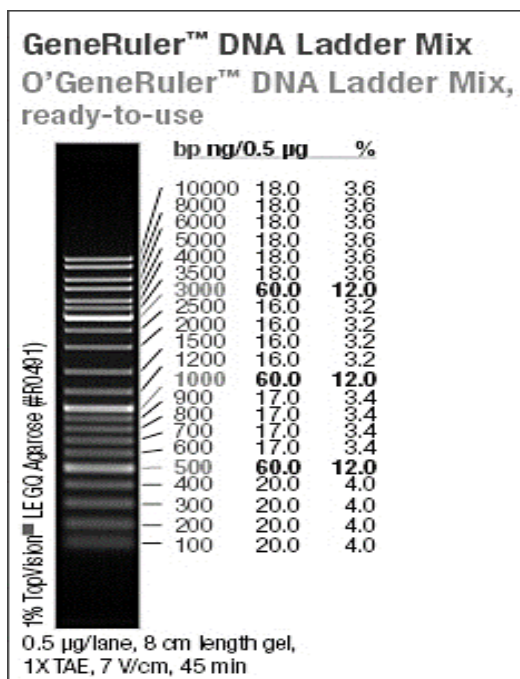
A korábban elkészített deléciós konstrukciót tartalmazó plazmidról PCR-rel amplifikáltuk a *pkaI* szegélyi régiót és KanMX6 gént tartalmazó szekvenciát a *pkaI* szekvenciaspecifikus primerekkel (7-8.táblázat). Ezt a lineáris DNS fragmentet (*pkaI*Δ-konstrukció) használtuk aztán a 7-1 törzs transzformálásához.

A sejteket 150ml YPL tápfolyadékba oltottunk és rázatva 16 órát 30°C-on inkubáltuk. A tenyészet OD₅₉₅-ja 4,7 volt melyből ezután 50ml-es Falcon csövekbe osztottuk szét, majd centrifugáltuk 4000 rpm-en 23°C-on. A pelletet háromszor 1ml, 1M-os szorbitollal mostuk, végezetül a sejteket 200µl 1M-os szorbitolba vettük fel, hogy a sejt koncentráció 1X10⁹-en legyen. A sejtekhez 10µl, 980 ng/µl koncentrációjú, *pkaI*Δ-konstrukció PCR termékét adtunk, majd szuszpendálás után a cső teljes tartalmát átraktuk elektroporátor küvettákba (BioRad Gene Pulser Xcell). Az elektroporáció kivitelezése 2300V, 25µF, és 200Ω-on történt, mely időtartama átlagosan 4,3 msec-volt. Ezután azonnal 800µl, 1M-os szorbitolt adtunk a küvettákhoz, majd inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 percig. Végezetül az elektroporátor küvetták tartalmát 50ml YPL-be pipettáztuk, és 16 órát inkubáltuk 30°C-on. Az így kapott sejttenyészetet lecentrifugáltuk, és a pelletből 100-100µl-t szélesztettünk 400µg/ml koncentrációjú G418-szulfát tartalmú YPA-ra. A csészéket 30°C-on inkubáltuk 6 napig.

A transzformálás hatékonyságának növelése érdekében a sejteket 13mM végkoncentrációjú hidroxü-urea-val szinkronizáltuk 2 órán keresztül YPL-ben, rázatva. A sejteket 2 alkalommal MilliQ vízzel, 3 alkalommal 1M-os szorbitollal mostuk, hogy a hidroxü ureát teljesen eltávolítsuk a sejtekről. Ezután a sejteket a fentebb leírt módon transzformáltuk.

III.4.13 Agaróz gélelektroforézis (Sambrook és Russel, 2006)

Az elektroforézishez TBE (Tris-Borát-EDTA) és TAE (Tris-Acetic acid-EDTA) és 1 tömeg %-os agarózt használtunk. A futtatási paraméterek: 120V, 1 óra futási idő volt. A marker 1 kbp-os DNS marker (Thermo Scientific, SM0332) volt, melynek 100 bp-volt a legkisebb és 10.000 bp- a legnagyobb sávja. (7. ábra)



7. ábra Agaróz gélelektroforézishez használt DNS marker és sávjainak méretei. (Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNS létra) [9]

III.4.14 RNS izolálás *Sch. japonicus*-ból

Több RNS izolálási protokoll-t kipróbáltunk. A probléma ezekkel az volt, hogy az RNS minősége ezekkel a módszerekkel alacsonynak bizonyult. Végül a Lyne és mtsai által kidolgozott protokollt követtük, mellyel mind az élesztő mind a hifás állapotú sejtekből kiváló minőségű RNS-t izoláltunk (Lyne, 2003). Az RNS-minták elkészítéséhez 20 db, petricsészén párhuzamosan tenyésztett *Sch. japonicus* élesztő, illetve hifás állapotú sejteket használtunk, melyeket egyenként egy csőbe mostunk. Az élesztő állapotú sejteket 48-órás tenyésztés után mostuk le a csészékről, míg a hifás állapotú sejteket 6 nap inkubáció után vágtuk ki, és mostuk össze. Az így keletkezett élesztő és hifás állapotú sejtekkkel dolgoztunk tovább. Első lépésként a sejteket mostuk DEPC-es vízzel háromszor. Ezután 750µl TES (10mM Tris-HCl pH7,5; 10mM EDTA pH8; 0,5% SDS) oldatban újraszuszpendáltuk a sejteket, majd azonnal 750µl savas fenol-kloroformot adtunk a szuszpenzióhoz, amit rövid vortex követett. Az így kapott szuszpenziót 65°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, mely során 10 perces időközönként 10 másodperces vortexet alkalmaztunk. Az inkubáció után jégen hűtöttük le a mintákat, majd 10 másodpercig vortexeltük a szuszpenziót. Ezután 14.000 rpm-en 5 percig 4°C-on centrifugáltuk a csöveket, majd a szétvált fázisokból a felsőt új csövekbe raktuk, a többit kidobtuk. A folyadékfázist még két alkalommal savas fenol kloroformmal tisztítottuk. Ezután 0,1 térfogat nátrium-acetát és 2,5V 100%-os etanol hozzáadásával kicsaptuk az RNS-t. A jobb hozam érdekében a mintákat -20°C-ra helyeztük 20 percre. Az inkubáció után centrifugáltuk a mintákat 14.000 rpm-en 15 percig 4°C-on. A felülúszó leöntése után 70%-os alkohollal mostuk a pelletet, majd a mintákat szárítottuk steril fülke alatt, hogy az alkoholt maximálisan elimináljuk. Végezetül 100µl DEPC vízben

vettük fel a mintákat. A minták minőségét nanodrop segítségével ellenőriztük, a tisztaság A=260/280-on 1,9 és 2,0 értékek között volt.

III.5 Bioinformatikai módszerek

A *Sch. japonicus* genom adatokat a www.broadinstitute.org oldalról töltöttük le. A fehérjeszekvenciák keresését a www.broadinstitute.org és NCBI oldalak BLAST opciója segítségével végeztük. A fajok közötti összehasonlításokat a www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ és www.ebi.ac.uk/Tools/psa/ oldalakon végeztük. Az RNS szekvenálási adatokat a UD-GenoMed szolgáltatta.

Az RNS szekvenálás kiértékelése során a cosmid nevekhez tartozó génnevek és a funkciók a Broad Institute adatbázisa, illetve BLASTp programja segítségével kerültek meghatározásra. A funkcionális csoportok megállapítása pedig a közeli rokon *Sch. pombe* ortholog génjeinek besorolása alapján történt. (www.pombase.org, Fission Yeast GO slim terms)

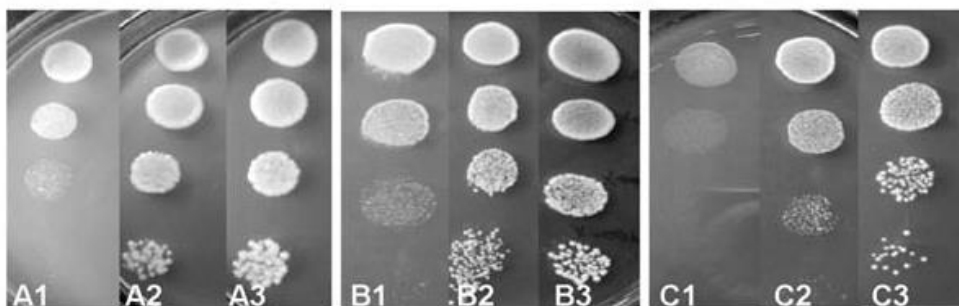
A *Sch. pombe pka1* target génjeit a <http://www.pombase.org/browse-curation/fission-yeast-go-slim-terms> oldalon található GO kategóriák alapján azonosítottuk, majd az orthológjait megkeresve az adatbázisban, megvizsgáltuk, hogy ezen orthológ gének mRNS szintje változott-e a mi RNS szekvenálási adataink szerint.

A DNS szekvenciákhoz tervezett primerek és restrikciós hasító helyek, valamint a plazmid térkép ellenőrzése a SnapGene Viewer program segítségével történt.

IV. Eredmények

IV.1.1 A *Sch. japonicus* optimális tenyésztési körülményeinek vizsgálata

Munkánk első lépéseként az optimális pH és hőmérséklettartományt vizsgáltuk meg. Az ábrán jól látható, hogy a vad típusú sejtek szaporodása 30 és 37°C-on, pH4-7 tartományokban volt a legerősebb. (8. ábra) További kísérleteinket, ezen eredményeket figyelembe vételével végeztük.



8. ábra Vad típusú *Sch. japonicus* [7-1] növekedési vizsgálata különböző pH-n és hőmérsékleten YPA táptalajon. **A1)** pH4 25°C. **A2)** pH4 30°C. **A3)** pH4 37°C. **B1)** pH7 25°C. **B2)** pH7 30°C. **B3)** pH7 37°C. **C1)** pH8 25°C. **C2)** pH8 30°C. **C3)** pH8 37°C.

IV.1.2 Dimorfizmust befolyásoló külső környezeti körülmények hatásának vizsgálata

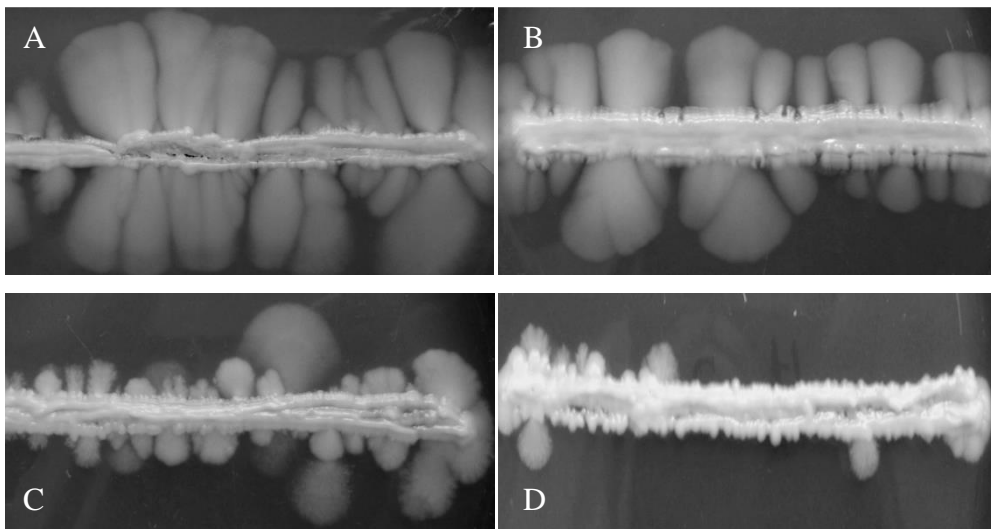
Mivel a *Sch. japonicus* dimorfizmust mutató hasadó élesztő, egyedülálló a *Schizosaccharomycetaceae* család tagjai között, s elég távoli rokona a *S. cerevisiae* vagy *C. albicans*-nak, így célul tűztük ki, hogy ezen élesztő morfológiai átváltását, azaz az élesztő fázisból fonalas növekedési fázisba való átalakulást szabályzó körülményeket, és az átalakulásban résztvevő géneket felderítjük. Ugyanis az itt kapott eredmények

rávilágíthatnak a dimorfizmus evolúciósan konzervatív jellemzőire éppen úgy, mint a fajspecifikus tulajdonságokra.

A kutatásunk első részében a morfológia átváltást indukáló illetve azt gátló körülményeket próbáltunk keresni.

IV.1.3 pH hatása a morfológiai átváltásra

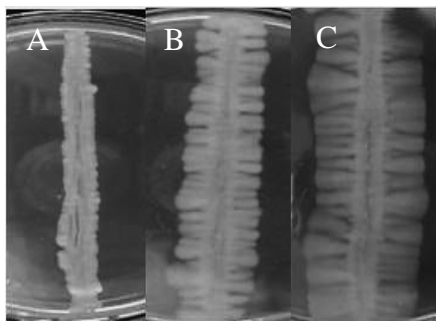
A legtöbb patogén gombánál felfedezhető, hogy a pH hatással van a morfológiai átváltásukra, ezért mi is megvizsgáltuk ennek hatását az *Sch. japonicus* sejtek esetén. Azt tapasztaltuk, hogy komplett táptalajon pH4-5-között a kontrollhoz (pH7) (9. ábra C) képest gyorsabban váltottak át a sejtek fonalas növekedésbe (9. ábra A, B) és hosszabb hifákat produkáltak. Bázikus pH-n (pH8) többnyire unicelluláris formában szaporodtak a sejtek és csak néhány hifakezdemény jelent meg (9. ábra D).



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

IV.1.4 A hőmérséklet hatása a morfológiai átváltásra

A dimorfizmust befolyásolhatja a hőmérséklet is, ezért itt a célunk a hőmérséklet és miceliális növekedés kapcsolatának vizsgálata volt. Azt tapasztaltuk, hogy 37°C-on a hifák növekedése szignifikánsan gyorsabb a 25°C és 30°C-hoz képest (10. ábra). Azaz, 25°C-on ez 1-1,5 hetet, addig 30°C-on ez 5 napot, 37°C-on 3 napot vett igénybe.



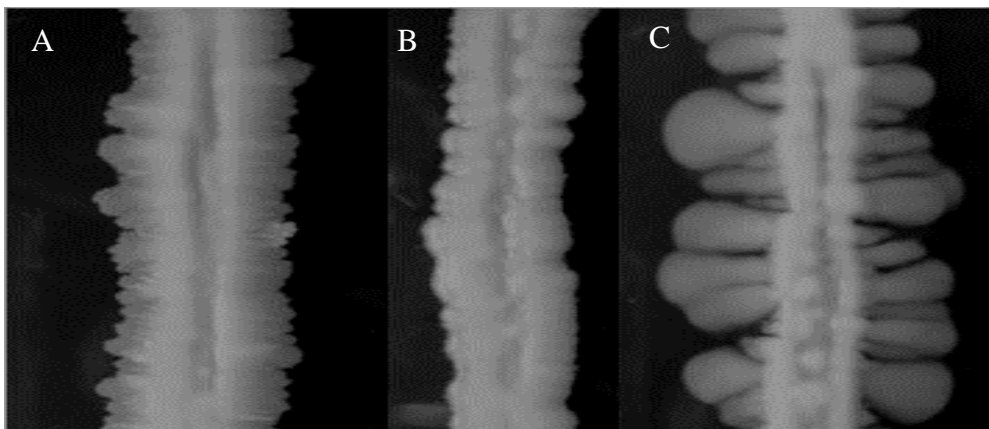
10. ábra A hőmérséklet hatása a 7-1 törzs morfológia átváltására. **A)** 25°C; **B)** 30°C; **C)** 37°C, a csészék 7 napig inkubálódtak.

IV.1.5 Pepton hatása a morfológiai átváltásra

A korábbi adatok (Sipiczki 1998) és a saját tapasztalataink is azt mutatták, hogy a hifák megjelenése és hossza különböző lehet a különböző táptalajokon. Ezért kétféle komplett táptalajon is megvizsgáltuk a hifák megjelenésének idejét és a hifák hosszát.

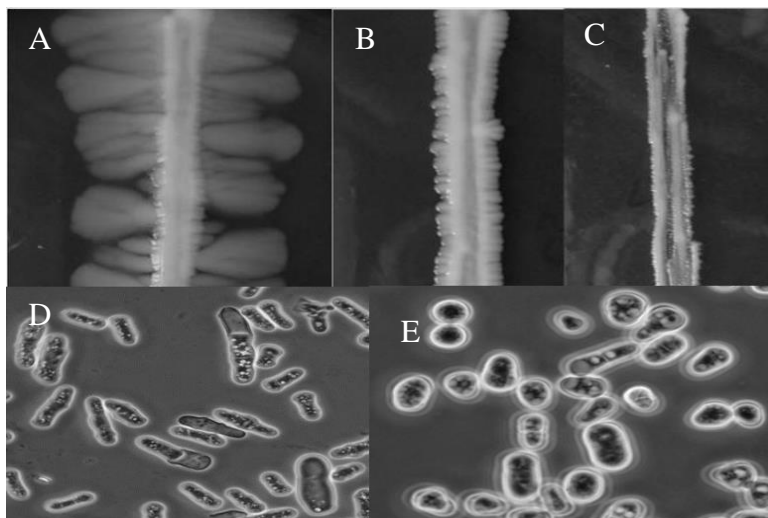
Kísérletes adatok alapján elmondhatjuk, hogy a YPA táptalajon időben szignifikánsan gyorsabban indult meg a miceliális növekedés, mint a YEA tápközegben. Ez igaz volt akkor is, ha különböző hőmérsékletet és pH-t használtunk. A két táptalaj között a különbség, hogy a YEA nem tartalmaz peptont, illetve a cukor koncentrációja 3%(m/m) a YPA 2%(m/m)-hoz képest. Azt gondoltuk, hogy talán a fentebb említettek okozzák ezt a

különbséget, ezért elkészítettük a YPA-t 3%(m/m)-os glükóz koncentrációval, illetve a YEA-t 2%-os cukor koncentrációval is. Minden esetben hamarabb indult meg a fonalas növekedés a pepton tartalmú táptalajon ahhoz képest, amelyik nem tartalmazott pepton (11. ábra).



11. ábra A pepton hatásának vizsgálata. **A)** YEA 3%(m/m) glükóz, **B)** YEA 2%(m/m) glükóz, **C)** YPA (2%(m/m) glükóz+ 1% pepton), 7-1 törzs, 30°C-on inkubálva 7 napig. (A különböző pH-val rendelkező táptalajokon és a különböző hőmérsékleteken hasonló eredményt kaptunk)

Továbbá megvizsgáltuk azt is, hogy a YPA táptalaj pepton koncentrációjának növelése miként hat a hifák kialakulására. Ezért készítettünk a III.3.4 fejezetben leírtak alapján YPA táptalajt. Azt tapasztaltuk, hogy 1-3% pepton koncentráció még elősegíti a fonalas formába történő átváltást, (11. ábra C; 12. ábra A) viszont 10% kifejezetten gátolta (12. ábra C), és a sejtek élesztő formában maradtak 2 hét után is. Illetve a sejtek mikroszkópos vizsgálata még azt is mutatta, hogy 10% pepton jelenlétében a sejtek egy része elpusztult (12. ábra D)

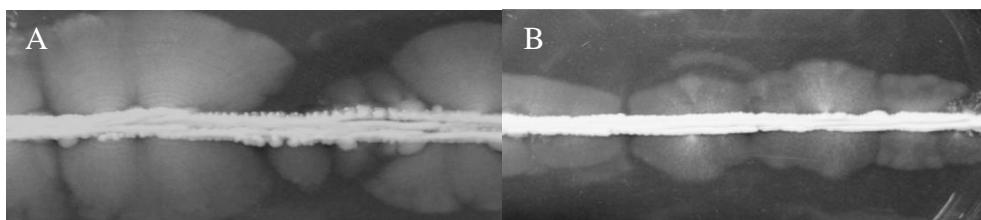


12. ábra A pepton koncentráció és hifaképzés közötti összefüggés vizsgálata a 7-1-es törzssel. **A)** YPA kontroll 1%(m/m) pepton, **B)** YPA+ 5%(m/m) pepton, **C)** YPA+ 10%(m/m) pepton, **D)** a 7-1 törzs sejtalakja YPA+ 10%(m/m) pepton tartalmú táptalajon, **E)** a 7-1 törzs sejtalakja 1% pepton tartalmú YPA-n. A sejtek 7 napig inkubálódtak 30°C-on. A D) és F) ábrákat 100x nagyítású objektívvel fényképeztük.

IV.1.6 Aminosavak hatása a hifaképzésre

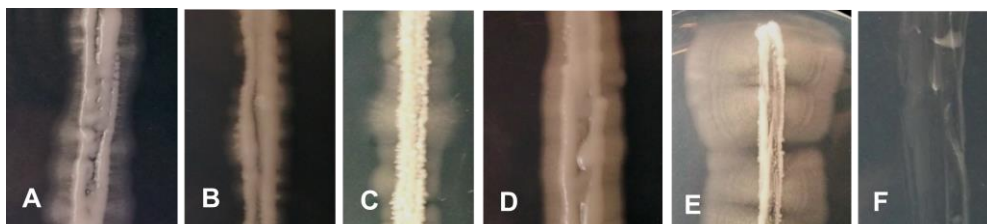
Mivel a pepton pozitív hatással volt alacsonyabb koncentrációkban a hifaképzésre, s ráadásul a szakirodalmi adatok szerint is képesek indukálni bizonyos aminosavak a hifás növekedést pl. *C. albicans*-ban (Kim és mtsai, 2006; O'Connor és mtsai, 2010), ezért kísérleteinkkel azt vizsgáltuk, hogy a különböző aminosavak hogyan hatnak a *Sch. japonicus* hifaképzésére. Első lépésként YPA táptalajhoz adtunk aminosavakat, viszont itt nem tapasztaltunk jelentős eltérést a kontrollhoz képest. Ahhoz, hogy más faktorok (pl. YPA esetében az élesztő kivonat) befolyását kizárjuk, EMMA minimál táptalajon is megismételtük a kísérletet. Ezen vizsgálat során az

argininnel kiegészített EMMA-n láttunk jelentős hatást a hifás növekedésre (13. ábra A), míg a többi aminosav esetén nem volt jelentős változás.



13. ábra Arginin hatásának vizsgálata a 7-1 törzs hifaképzésére. **A)** EMMA+10mM arginin; **B)** EMMA kontroll

Készítettünk olyan EMMA-kat melyekből kihagytuk a nitrogénforrást, és ezt a vizsgálni kívánt aminosavakkal helyettesítettük. Ugyanis kíváncsiak voltunk, hogy a *Sch. japonicus* képes-e az adott aminosavat nitrogén forrásként hasznosítani. Azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált aminosavak közül a sejt a többséget tudta hasznosítani, kivéve a prolint, ugyanis ezen a táptalajon a sejtek nem voltak képesek növekedni, azaz nem tudták egyedüli N -forrásként hasznosítani. (14. ábra F) Az izoleucin nem volt jelentős hatással a hifás növekedésre, míg a leucin kifejezetten gátolta a fonalas növekedést. (14. ábra B és C) Az arginin és metionin képesek voltak elősegíteni a dimorf átváltást (14. ábra D és E) Az arginin ilyen mértékű indukáló hatása talán annak az eredménye, hogy az aminosav láncában 3 nitrogén csoport található, mely viszonylag gazdagabb nitrogénforrásnak számít a többi aminosavhoz képest.

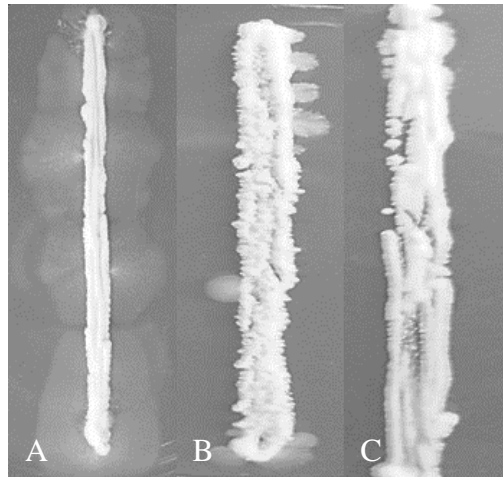


14. ábra *Sch. japonicus* sejtek szaporodása és hifaképzése N-forrás nélküli (NH_4Cl), 10mM aminosavval kiegészített minimál táptalajon (EMMA).

A) EMMA + NH₄Cl, **B)** EMMA-N+leucin, **C)** EMMA-N+izoleucin, **D)** EMMA-N+metionin **E)** EMMA-N+arginin, **F)** EMMA-N+prolin

IV.1.7 Adenin és guanin hatása a hifaképzésre

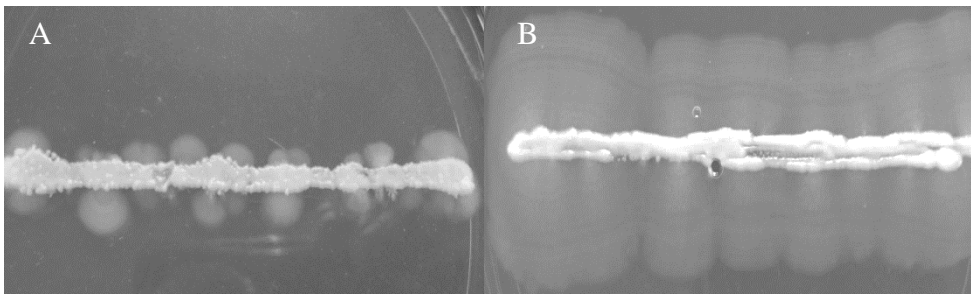
Az élesztő-hifa átváltás vizsgálata során megnéztük az adenin és guanin hatását is. Érdekes módon ezek a nukleobázisok is befolyásolták a hifaképzést. Vizsgálataink során a hifázást indukáló YPA táptalajhoz 0,1-2mg/ml koncentrációban adenint valamint guanint adtunk. Azt tapasztaltuk, hogy az adenin már 0,5 mg/ml koncentrációban képes volt a hifázást szignifikánsan gátolni, a sejteket élesztő állapotban tartani. A guanin szintén képes volt gátolni a hifázást, viszont csak 1 mg/ml koncentrációban (15. ábra).



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

IV.1.8 Vitaminok és nyomelemek hatása

A *Sch. japonicus* hifázását minimál tápközegben vizsgálva megállapítottuk, hogy a táptalajt alkotó vitaminok koncentrációja is befolyásolja a hifák méretét, növekedési sebességét, és a kiindulási gócpontok mennyiségét. Már 2x mennyiségben is jelentős indukáló hatást mutattak, de a legszignifikánsabb indukáló hatást 10x vitaminkoncentráción értük el (16. ábra).



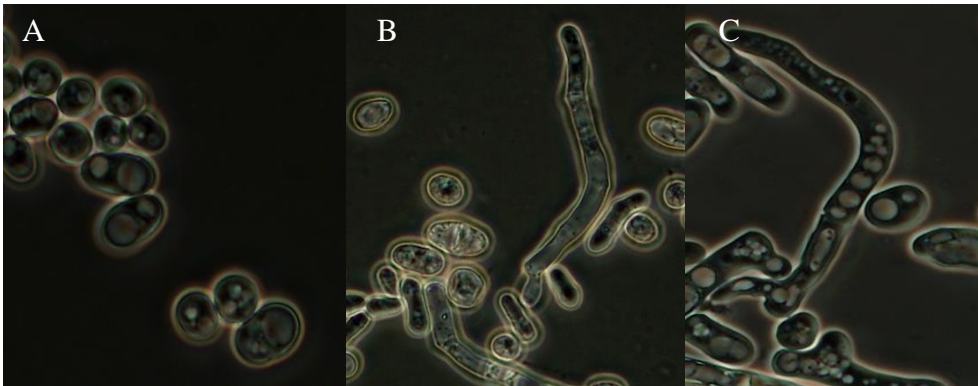
16. ábra A vitamin koncentráció hatása a fonalas növekedésre. **A)** EMMA kontroll; **B)** EMMA + 10x vitamin koncentráció

IV.2 Hifás átváltás indukciója folyékony tápközegben

Az előző kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a *Sch. japonicus* hifa képzéséhez szilárd táptalaj szükséges. (Sipczki és mtsai, 1998) Mivel a molekuláris vizsgálatokhoz pedig a folyadék táptalajban való tenyésztés lenne az ideális, ezért elindítottuk a tápfolyadékokban való morfológiai átváltás vizsgálatait is. Azaz, megpróbáltuk a külső körülmények változtatásával és a tápfolyadékok módosításával kideríteni van-e olyan körülmény, amely indukálja folyékony táptalajban is a hifaképzést, s elegendő számú és hosszúságú hifát eredményez.

IV.2.1 Minimál tápfolyadék és ozmotikus stressz hatása

Először a minimál tápfolyadékban és a stresszkörülmények között vizsgáltuk a miceliális növekedést. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy minimál tápfolyadék, ami igencsak szegényes körülményeket jelent a sejtek számára, illetve az 1M szorbitol ozmotikum hatására is indukálódik az élesztő- hifa átváltás (17. ábra). Azonban sem a hifák száma, sem a hossza nem volt kielégítő.

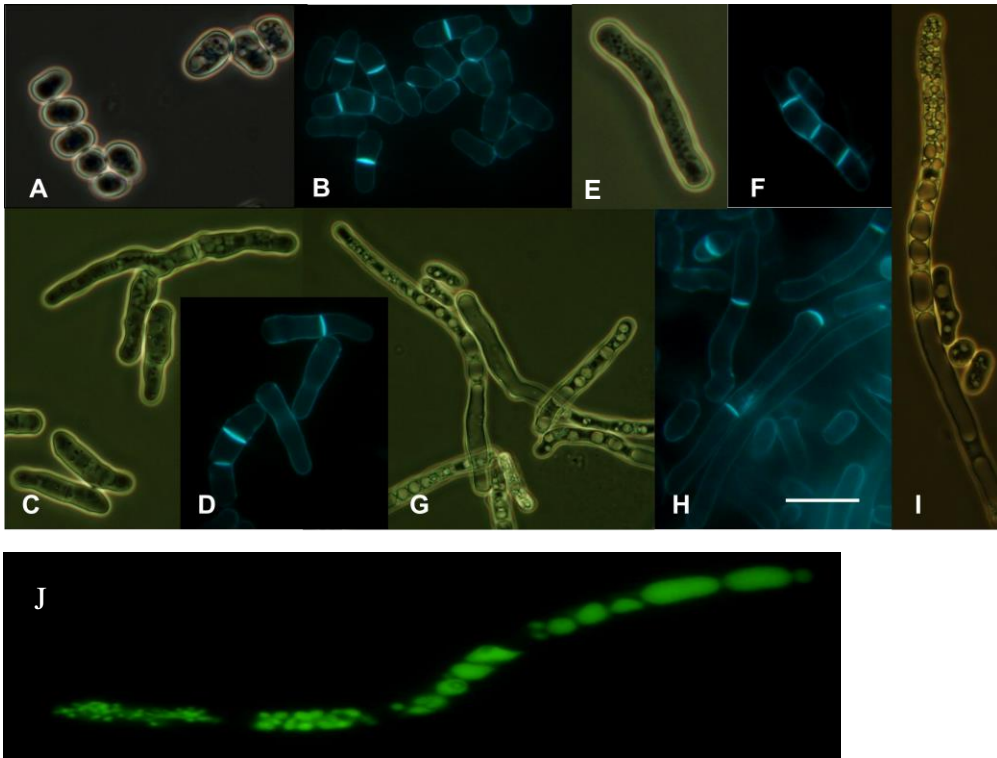


17. ábra Minimál körülmények és ozmotikus stressz hatása 7-1 törzs hifaképzésére. **A)** YPL, **B)** EMMML minimál tápfolyadék **C)** YPL+1M sorbitol, 37°C, 1 nap inkubáció után. Az ábrákat 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

IV.2.2 FBS (Fetal Bovine Serum) indukció

Magzati borjú vérszérum (FBS) hatására a dimorf patogén gombák egy része, így a *C. albicans* fonalas növekedésbe vált át (Barlow és mtsai, 1974; Feng és mtsai, 1999, Nantel és mtsai, 2002) Ezért kipróbáltuk, hogy a *Sch. japonicus*-ra milyen hatással van, van-e egyáltalán hatással a szérum. Laboratóriumunkban komplett tápfolyadék felhasználásával 5 és 10% szérumot tartalmazó hígítási sort hoztunk létre, melyekbe *Sch. japonicus*-t

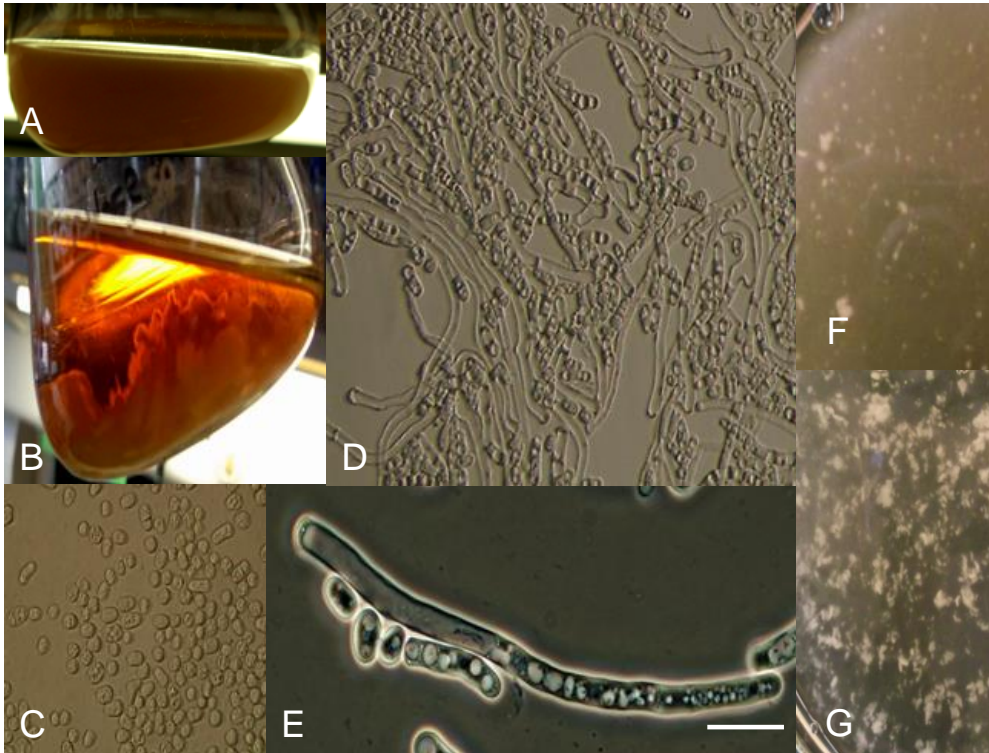
oltottunk. A lombikokat 25, 30 és 37°C-os hőmérsékleten inkubáltuk, 16 órát. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét koncentráción és minden hőmérsékleten képes volt a filamentózus növekedést kiváltani az FBS, a kontrollhoz képest. Azaz, a *Sch. japonicus* ugyanúgy képes érzékelni az FBS-t, mind pl. a *C. albicans*. (18. ábra)



18. ábra A *Sch. japonicus* sejtek morfológiája YPL+ 10% FBS tápfolyadékban. (rázatás nélkül) **A-B)** 7-1 kontroll YPL 25-30 és 37°C-on. **C-D)** YPL+FBS 25°C-on. **E-F)** YPL+FBS 30°C-on. **G-I)** YPL+FBS 37°C-on. **B,D,F,H)** szeptum festés calcofluorral. **J)** vakuólum festés Bar:10μm. Az ábrákat 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a szérumkoncentráció növelése milyen hatással van az élesztő-hifa átváltásra. Eredményeink azt mutatták, hogy a hifák mennyisége egyenes arányban volt a szérum koncentrációjával,

valamint a hőmérséklet emelkedésével. A legtöbb hifát ugyanis 37°C-on 50%-os szérum koncentráció mellett mutattuk ki. (19. ábra B, D)

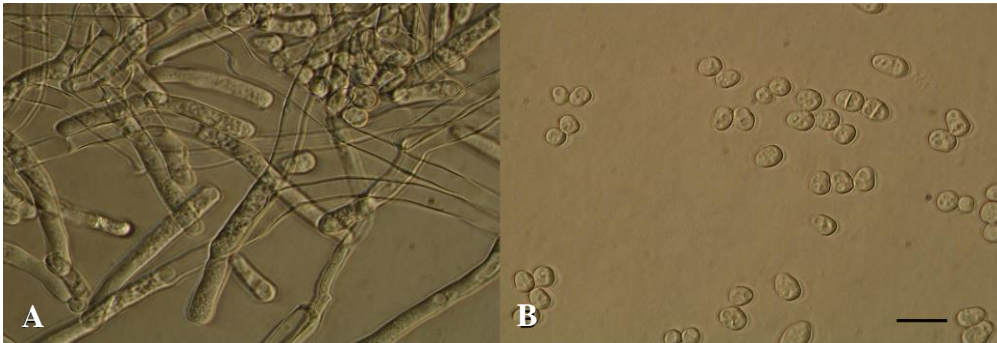


19. ábra A *Sch. japonicus* sejtek 50%-os FBS- szérumban. **A)** YPL kontroll. **B)** YPL + 50% FBS szérum okozta flokkuláció. **C)** Sejtmorfológia YPL-ben. **D-E)** Az 50%-os szérum hatása a sejtmorfológiára. **F)** összecsapzódás YPL + 50% FBS tápfolyadékban pH5,5-n **G)** összecsapzódás YPL + 50% FBS tápfolyadékban pH:6,7-n. **C)** és **D)** Nomarski felvétel. Skála: 10 μ m. A mikroszkópos ábrákat 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

Jellemző volt, az erőteljes vakuolizáció, hasonlóan a szilárd táptalajon megfigyeltekhez (Sipiczki, 1998) (19. ábra E), valamint, hogy nagyon nagymértékű volt a fonalak összecsapzódása, különösen 6,7 pH-n (19. ábra G) melyek egyben rendkívül hosszúak is voltak. (19. ábra E, 18. ábra I, J)

Mivel a szérum meglehetősen összetett és sok komponenst tartalmaz, de főleg peptideket és hormonokat (Barlow és mtsai, 1974; White és Larsen, 1997; Zeng, 2006), így arra gondoltunk, hogy ha az FBS fehérjéi okozzák a miceliális növekedést, akkor azok hatása hőkezeléssel eliminálható.

Ennek kiderítéséhez hőkezelést alkalmaztunk, mely feltevésünket igazolta, ugyanis az egy éjszakás 37°C-os inkubáció után nem tapasztaltunk fonalas növekedést a hőkezelt FBS tartalmú tápfolyadékban (20. ábra).



20. ábra Sejtmorfológia vizsgálata a hőkezelt FBS tartalmú tápfolyadékban. **A)** YPL+10% FBS szérum **B)** forráspontig hevített YPL+10% FBS. Skála: 10µm. Az ábrákat 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

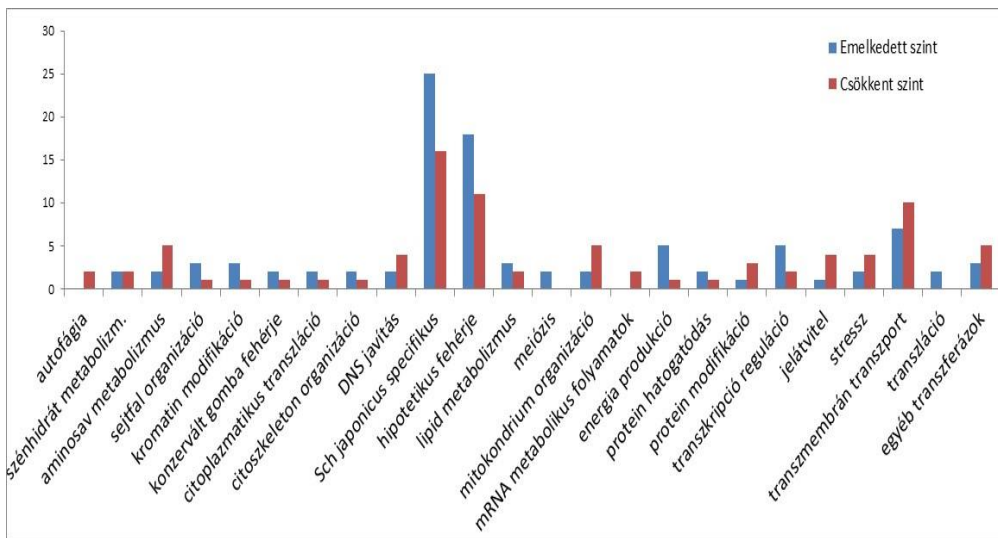
IV.3 Hifaképzésben szerepet játszó gének azonosítása

IV.3.1 RNS izolálás és szekvenálás élesztő és hifás állapotú *Sch. japonicus*-ból

Célunk a hifázásban szerepet játszó gének azonosítása volt, melyhez egy modern, és meglehetősen jó hatásfokú módszert, az RNS szekvenálást alkalmaztuk. Az eljárás eredményeként a hifában az élesztő állapothoz képest 2903 gén szintje szignifikánsan változott, melyből 1366 gén szintje emelkedett, míg 1537 gén szintje csökkent. Ezeket a számokat kicsit óvatosan kell kezelnünk, hiszen ez nem azt jelenti, hogy ennyi gén szükséges a hifázáshoz, inkább egy adott körülményre adott szignifikáns „génválaszok”

összessége. Mivel az értékek 2-es alapú logaritmikus skálán lettek normalizálva, esetünkben a szintváltozások -6 tól +6-ig terjedtek. A biztonság kedvéért azonban csak a jelentősebb változást mutató géneket, azaz a -2 től a -6 -ig terjedő csökkent értékeket illetve a +2-től +6-ig terjedő emelkedett értékeket vettük figyelembe. Így elmondhatjuk, hogy az emelkedett kifejeződési szintet mutató 117 és a csökkent szintet mutató 112 gén bizonyosan részt vesz a morfológiai átváltás folyamatában. (Függelék 1. táblázat)

Ezeknek a géneknek az elemzése során a legszembetűnőbb eredmény az volt, hogy nagyon nagy százalékban fordult elő *Sch. japonicus* specifikus és hipotetikus fehérje, amelyek funkciója jelenleg ismeretlen. (21. ábra)



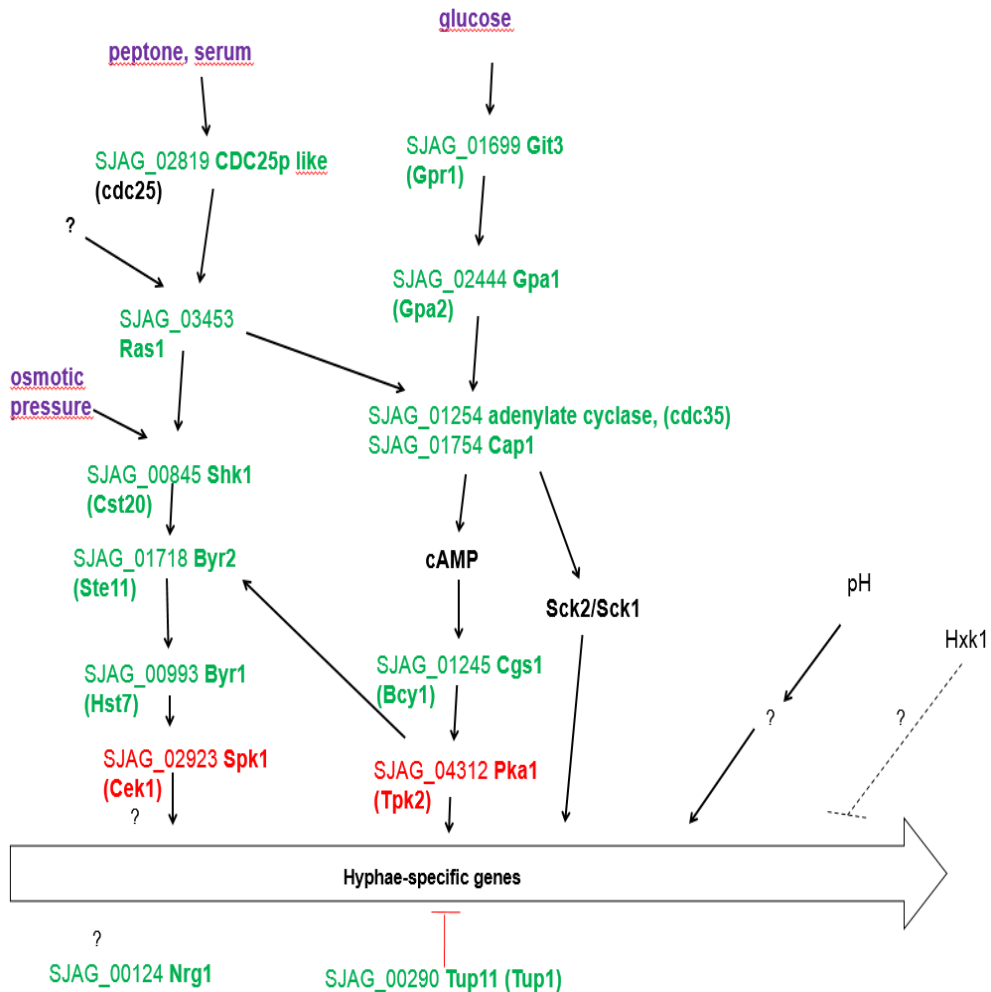
21. ábra A dimorfizmusban feltehetően jelentős szerepet játszó gének funkciói és RNS szint változása. (X-tengely: funkciók, Y tengely: a gének száma)

Azok között pedig, amelyeknek a funkciója meghatározható volt, igen jelentős számban fordultak elő a transzmembrán transzport, a DNS javítás, a mitokondrium organizáció, valamint az aminosav metabolizmus génjei. Ezek

többségének mRNS szintje lecsökkent. A \log_2 fold +2-től +6ig terjedő intervallumban pedig a sejtfal biogenezis, a transzkripció reguláció, energia produkció valamint a translációban szerepet játszó gének mRNS szintje emelkedett meg. (21. ábra)

A továbbiakban szeretnénk volna meghatározni azokat a géneket, amelyek fajtól független résztvevői a dimorfizmus szignál-transzdukciós útvonalainak. Ugyan a *C. albicans* távoli rokon, viszont sok dimorfizmusban szerepet játszó génje már ismert, ezért döntöttünk úgy, hogy ezt a patogént választjuk összehasonlítási alapként.

Biswas 2007-es összefoglaló cikkében közölte, a dimorfizmust reguláló fontosabb géneket és az általa szerkesztett útvonalat véve alapul, megpróbáltunk mi is az RNS szekvenálási adatainkból egy jelátviteli rendszert szerkeszteni (Biswas és mtsai, 2007). A *Candida* gének illetve géntermékek homológjainak azonosításával meg is találtuk a MAPK útvonal, illetve a cAMP-PKA út fontosabb elemeit a *Sch. japonicus*-ban is. (22. ábra)



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

Mint látható, a fenti gének mindkét fajban egyaránt részt vesznek a morfológiai átváltásban az élesztő formából fonalas formába való

átalakulásban. Így e gének a dimorfizmus olyan résztvevői, melyek feltehetően fajtól függetlenek, s evolúciósan konzerváltak.

Közülük is kiemelendő egy érdekes és egyben meglepő gén, melyről szakirodalmi adatok, mint hifázást reguláló transzkripciós faktort említene. Ez az NRG1, mely *C. albicans*-ban, *C. neoformans*-ban egyaránt a patogenezisben fontos szerepet játszó génként jelenik meg (Braun és mtsai, 2001; Murad és mtsai, 2001; Cramer és mtsai, 2006). *S. cerevisiae* esetében az NRG1 inkább a stresszválaszban és a glükóz anyagcserében tölt be fontos szerepet (Park és mtsai, 1999; Vyas és mtsai, 2005). Érdekes azonban, hogy a *Schizosaccharomycetaceae* család többi tagja (melyek egyébként nem mutatnak dimorfizmust) nem rendelkezik ezen génnel, ami talán arra enged következtetni, hogy a hifázáshoz mint ősibb jelleghez szükséges e gén jelenléte.

A másik ilyen fontos regulátora e folyamatnak a *pkal* kináz, mely szintén részt vesz a legtöbb ismert patogén gomba dimorfizmusában (Robertson és Fink, 1998; Pan és Heitman, 1999, Cassola és mtsai, 2004, Cervantes-Chávez és mtsai, 2009). Az *Sch. japonicus*-ban ráadásul azért is érdekes ez a gén, mert ellentétben a *S. cerevisiae* és *C. albicans*-al, e fajban csak egyetlen gén kódolja a PKA katalitikus alegységét (SJAG_04312), hasonlóan a közeli rokon *Sch. pombe*-hoz (Maeda 1994). Ezért a továbbiakban e regulátor gén vizsgálatára összpontosítottunk.

IV.3.2 *pkal* gén bioinformatikai analízise

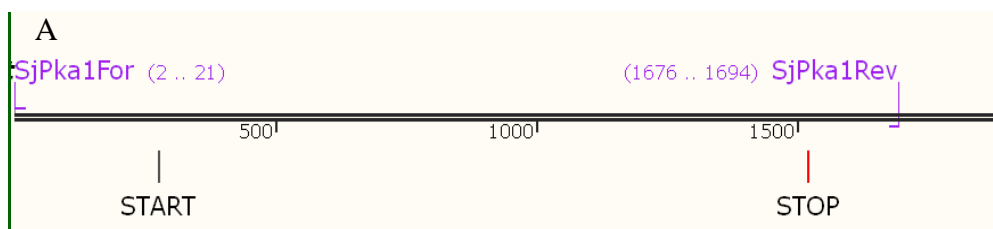
A PKA protein a cAMP-PKA útvonal egy tetramer szerkezetű fontos regulátora, melynek katalitikus alegységét kódoló gén bioinformatikai és kísérletes vizsgálatát végeztük el a továbbiakban.

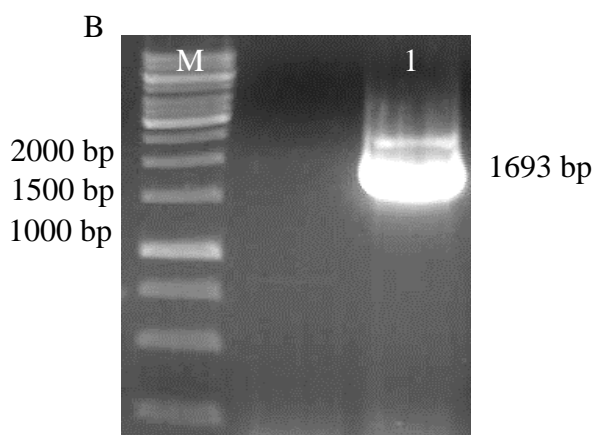
magenta színű betűk a bázikus oldalláncú aminosavakat; a zöld színű betűk pedig a hidroxil, szulfhidril és amin csoportokat jelölik. [10]

IV.4 Protein kináz A (PKA) gén törlése a *Sch. japonicus* kromoszómájáról.

IV.4.1 A *pka1* deléciós konstrukciójának elkészítése

Ahhoz, hogy egy gén funkcióját kiderítsük, illetve regulátor gének esetén a „target géneket” azonosíthassuk, a leghatékonyabb módszer a vizsgálandó gén deletálása és a deléciós mutáns törzs analízise. Mi is ezt a módszert követtük. Így a 7-1 vad típusú *Sch. japonicus* törzsből genomi DNS-t izoláltunk, melyről magas hűségű polimeráz segítségével (Phusion) felszaporítottuk a *pka1* gént. A PCR termék a gén start kodonjától 273 bázispárral, a stop kodontól 173 bázispárral hosszabb. Azért így terveztük meg a konstrukciót, hogy maradjon elég méretű szakasz a homológ rekombinációhoz. (24. ábra A)





24. ábra A *pka1* gén amplifikációja PCR-rel. **A)** konstrukció vázlata és primerei (SjPka1For és SjPka1Rev) **B)** a *pka1* PCR termék gélelektroforézis képe. A sáv mérete 1693bp. (1 = PCR termék, M = 1 kb-os méret marker) Az **A)** ábra a SnapGene viewer program segítségével készült. [8]

Az így keletkezett lineáris termék mérete 1693 bázispár volt, melyet pJET1.2/blunt klónozó vektorba (2974 bp) ligáltunk. (25. ábra)



25. ábra A *pka1* gén pJET1.2/blunt vektorba ligálva. A teljes DNS konstrukció mérete 4667 bp.

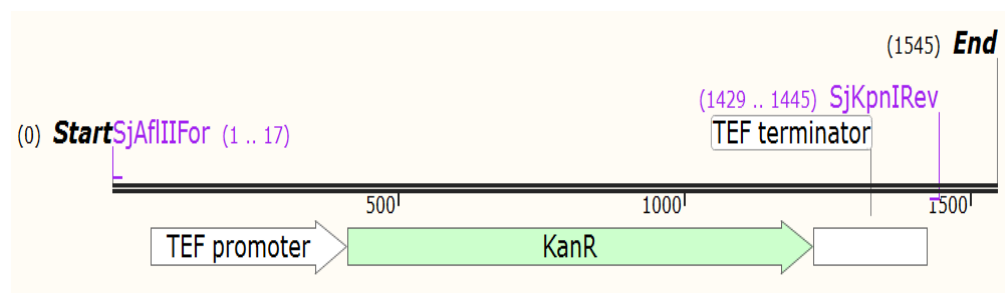
Ezután, a plazmidot emésztettük AflIII és KpnI restrikciós endonukleázokkal, melyek csak a *pka1* gént hasítják a gén 229. valamint 1397. nukleotid pozíciójában. Ennek az lett az eredménye, hogy a génből kivágódott egy 1168 bázispár hosszúságú darab, és a vektorhoz ligálva megmaradt

egyenként egy 229, és egy 302 bázispáros szegélyi szakasz. Ezek képezték a későbbi rekombinációhoz szükséges homológ szakaszokat. (26. ábra)



26. ábra A pJET1.2/blunt vektor + *pka1* szegélyi régiók kékel, a restriktációs enzimek vágóhelye pirossal jelölve. A vektor teljes mérete 3499 bp.

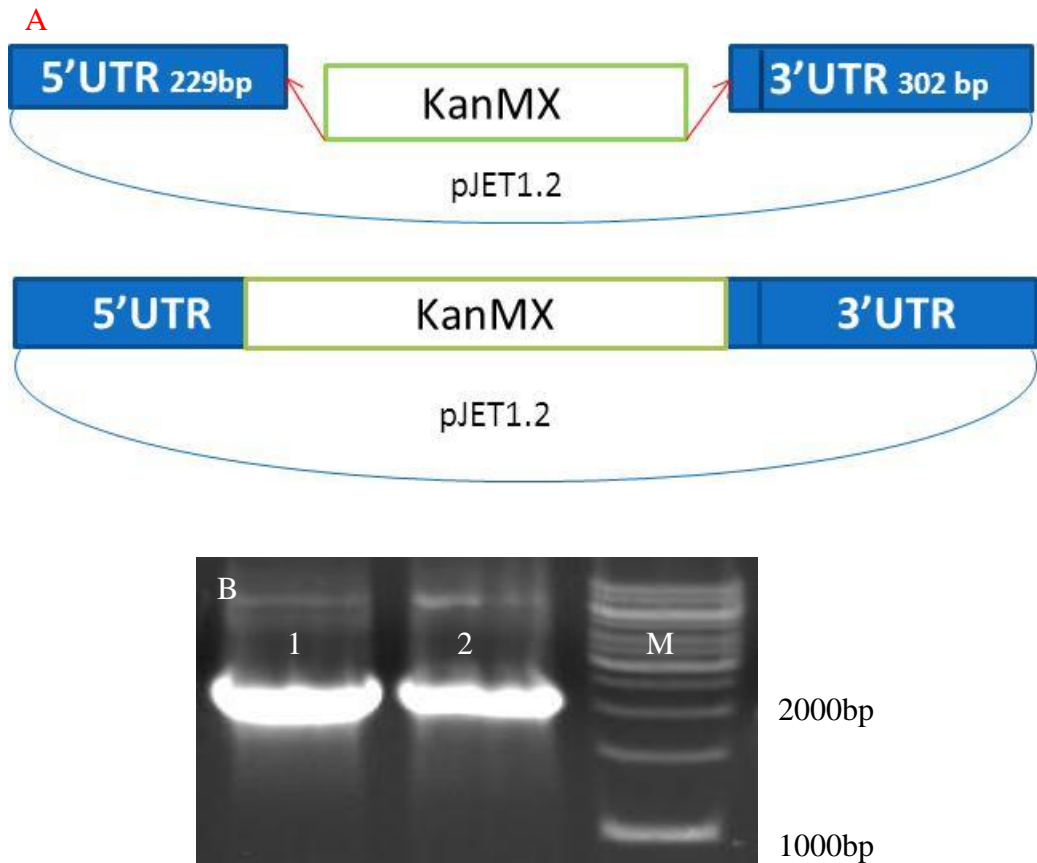
Ezzel párhuzamosan, ugyancsak magas hűségű polimerázzal (New England Biolabs Phusion HF polymerase) a KanMX6 kazettát olyan primerekkel szaporítottuk fel, melynek 5' végei egyenként az AflIII illetve a KpnI hasító helyeket tartalmazták. (27. ábra) A PCR termék mérete 1467 bp-nak adódott. E darab emésztése nem járt szignifikáns méretváltozással, ugyanis itt a végekről 3-3 bp vágódott le, kialakítva a ragadós végeket.



27. ábra A KanMX6 kazetta felépítése és primerjei. A felszaporítandó szakasz 1467bp. Az ábra a SnapGene viewer programmal készült. [8]

Az így létrejött pJET1.2/blunt + *pka1* szegély DNS-t ligáltuk a már AflIII és KpnI enzimekkel emésztett KanMX6 szelekciós markerrel, létrehozva így a

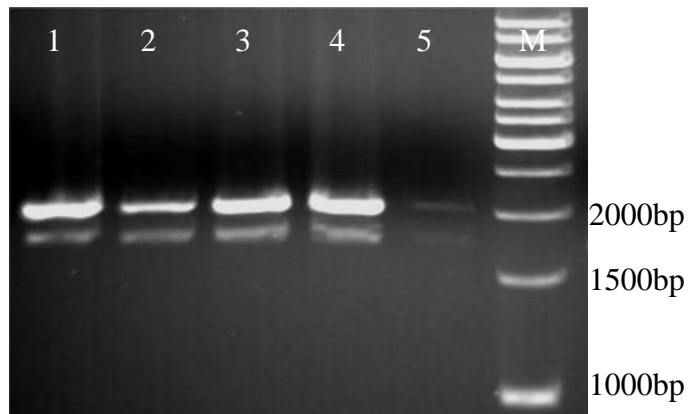
deléciós konstrukciót. (26. ábra A) Az így keletkezett plazmid mérete 4976 bp, melyből a deléciós konstrukció mérete 2002 bázispár (28. ábra B)



28. ábra A *pka1* deléciós konstrukció felépítése. **A)** vázlata (233 bp upstream a 302 bp downstream és az 1467 bp KanMX kazetta) melynek teljes mérete 2002 bp. **B)** *pka1* deléciós konstrukció gélelektrofotikus képe (Pka1For és Pka1Rev primerekkel). (1, 2 = PCR termékek, M = 1 kb-os méret marker)

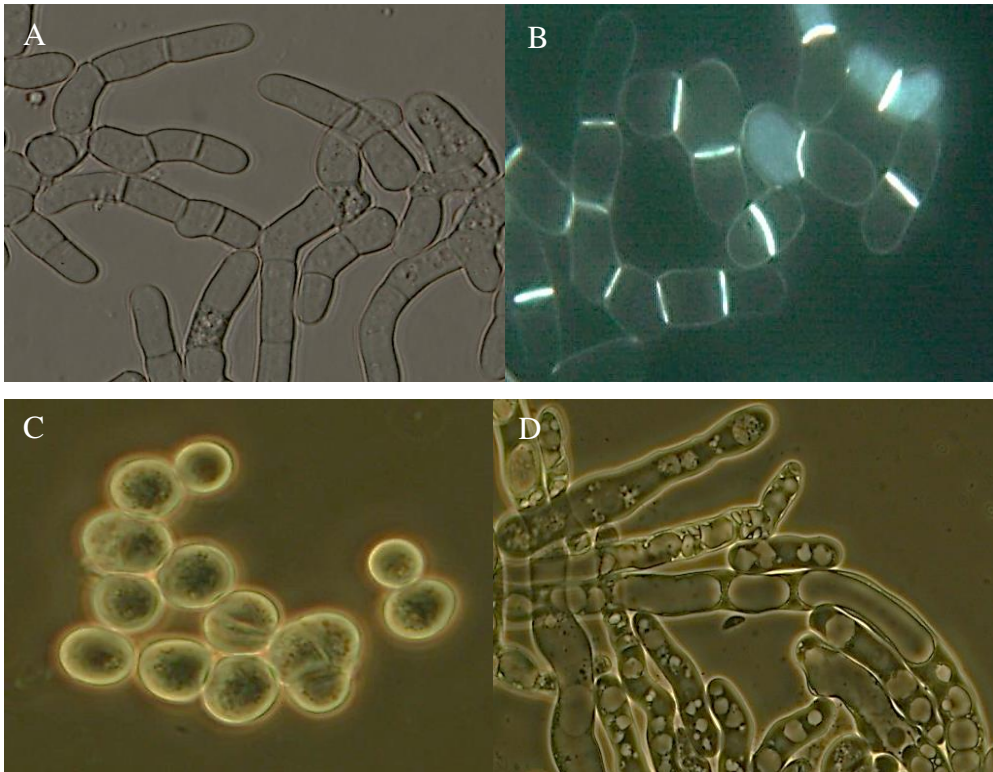
IV.4.2 *Sch. japonicus* 7-1 törzsének integratív transzformálása elektroporátorral

Az élesztősejtek transzformálását elektroporációval végeztük. Mivel a legközelebbi rokon faj, az *Sch. pombe*, melyre jól kidolgozott molekuláris módszerek vannak, ezeket az alapvető molekuláris technikákat alkalmaztunk a *Sch. japonicus* esetében is. Így a transzformálásban is követtük ezt a protokollt. (III.2.11. fejezet) Azt tapasztaltuk azonban, hogy a *Sch. japonicus* meglehetősen nehezen transzformálható. Ez azt jelenti, hogy számos kísérletet elvégezve, többszöri ismétléssel is mindössze 1-2 alkalommal kaptunk transzformánsokat. Ha pedig a transzformálás sikeres volt, akkor az élesztő igen erős nem homológ rekombinációs javító útvonalával (NHEJ) találtuk szembe magunkat, ami miatt a kapott telepek 99%-ban nem a célhelyre épült be a konstrukciónk. (29. ábra)



29. ábra Transzformánsok ellenőrzése PCR-rel. A képen látható, hogy mind az eredeti 1693 bp-os *pka1^{Sj}* és a 2002 bp-os pJET1.2/blunt +*pka1* szegély + KanMX konstrukció sávja megtalálható a transzformáns sejtekben, vagyis a nem homológ rekombináció javító útvonal „áldozata” lett a konstrukciónk. (az 1-5.-ig terjedő számok a minták sorrendjét jelölik, M = 1 kb-os méret marker)

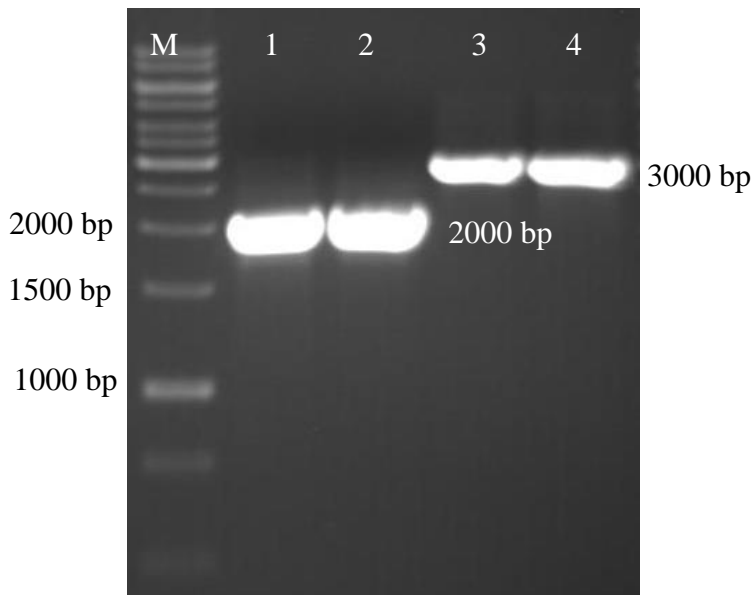
A célhelyre történő konstrukció beépítés sikertelensége és az NHEJ egyben érdekes *Sch. japonicus* fenotípusokat is eredményezett. (30. ábra) Valószínűleg, a konstrukciónk olyan gént (géneket) szakíthatott meg, melyek a sejtciklusban, és/vagy a dimorf átváltásban közvetlenül vagy közvetetten fontos szerepet játszanak. Ugyanis a vad típustól eltérő láncos morfológiával rendelkező mutánsokat (30. ábra A, B), kerekded sejteket, melyek gyengébben tudtak hifákat létrehozni (30. ábra C), valamint folyton fonalas növekedést mutató (30. ábra D) mutánsokat egyaránt kaptunk.



30. ábra A NHEJ eredményeként létrejött transzformáns *Sch. japonicus* sejtek mikroszkópos képei, melyek ismeretlen génekből sérültek. **A)** sejtseparációban sérült, láncos fenotípusú sejtek, (Normarski mikroszkópia); és fluorescens mikroszkópos képe calcofluorral festve **(B)**; **C)** lekerekedett, „golyószerű” sejtek melyek gyengébben tudtak hifázni; **D)** konstansan hifázó

sejtek. A sejtek 30°C-on 5 napig inkubált YPA csészéről származnak. Az ábrákat 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

Nagyon sok élesztő ezzel a javító mechanizmussal rekombinálja a bejuttatott DNS darabot. Ismert az a tény, hogy replikáció során a replikációs villák törést szenvedhetnek, és ilyenkor a homológ rekombináció részesül előnyben az NHEJ-hez képest. Ezért úgy gondoltuk, hogy ha elérhetnénk azt, hogy akkor transzformáljuk az élesztőnket, amikor replikálja a genomját (S-fázis) akkor jó esélyünk van homológ módon beépült transzformánsokat kapnunk. Ennek megvalósításához S-fázisban szinkronizáltuk a sejteket hidroxürea-val (HU) a transzformálás előtt. Ennek az eredménye az lett, hogy 20%-al megemelkedett a homológ rekombinációk száma (31. ábra 1-4)

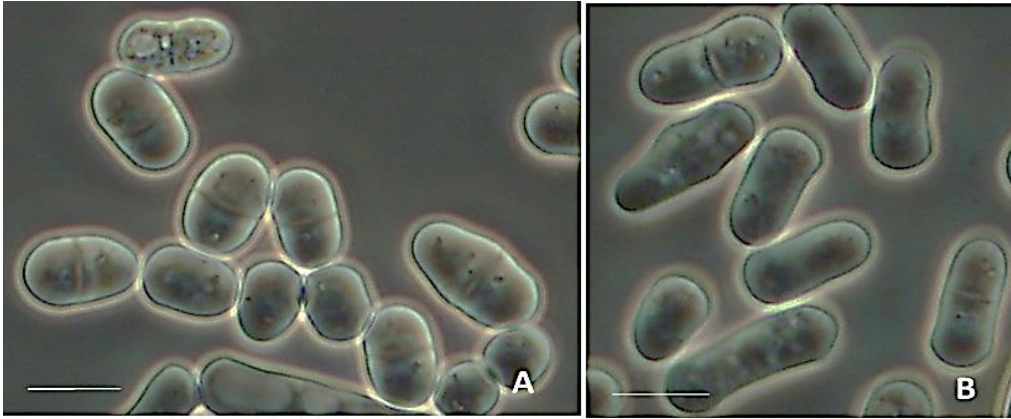


31. ábra A hidroxürea-val kezelt sejtek transzformálásából kapott telepek homológ rekombinációjának ellenőrzése. Az 1, 2 sávok a Sjpka1For és Sjpka1Rev primerekkel, míg a 3, 4 sávok a Sjpka1For és Sjpka1RDost primerekkel készült ellenőrző PCR képe látható. (M = 1kb-os méret marker)

IV.5 A protein kináz A (*pka1^{Sj}*) mutáns jellemzése

IV.5.1 A *pka1* deléciós mutáns sejt morfológiája

Kísérleteink első lépése a létrehozott mutáns törzs fenotípusos vizsgálata volt. Elsődleges fenotípusos eredményünk, hogy a *Sch. japonicus* *pka1* gén deléciója nem letális. A morfológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy bár a sejt alakjában nem történt változás, a sejt méretére viszont a *pka1* gén hiánya befolyással volt. Mérési eredményeink alapján a vad típusú sejtek átlagosan 5,5 μm , míg a *pka1* mutáns sejtjei 6,2 μm nagyságúak voltak YEA táptalajon, 25°C-on (32. ábra) Hasonló mértékű eltérést tapasztaltunk 30°C és 37°C-on is.



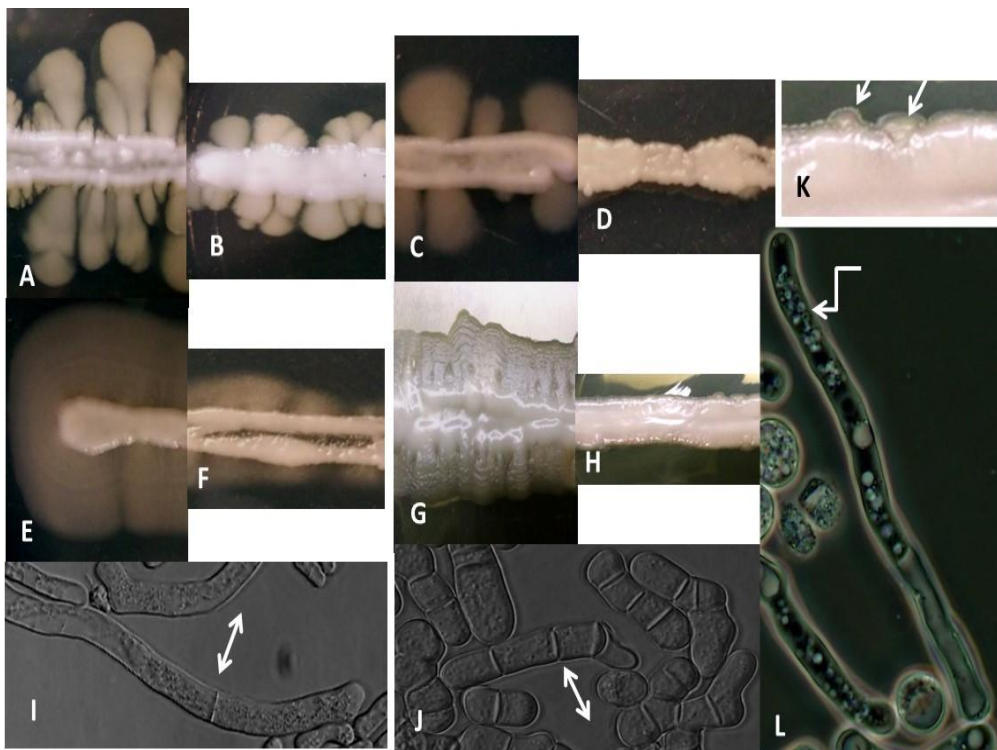
32. ábra A) vad típus [5,5 μm] és B) *pka1* mutáns [6,2 μm] sejt morfológiája és sejt mérete YEA táptalajon 25°C-on 1 nap után. Az ábrákat 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

IV.5.2 A *pka1* mutáns morfológiai átváltásának vizsgálata

További kísérleteink a dimorf átváltás vizsgálatára irányultak. Elsődlegesen azt szeretnénk volna megtudni, hogy a morfológiai átváltás módosult-e a mutánsban, és ha igen, akkor a vad típushoz képest ez milyen módon változott. Ezért komplett táptalajon, hifázást indukáló körülmények

között vizsgáltuk a *pka1Δ* törzs morfológiáját úgy, amint a IV.1-ben a 7-1 törzs esetében azt már láthattuk.

Szilárd táptalajon végzett vizsgálataink alapján elmondható, hogy YPA táptalajon a mutáns törzs hifái jóval rövidebbek (33. ábra B) a vad típushoz képest (33. ábra A). Az EMMA minimál táptalajon pedig szinte teljesen eliminálódott a hifázás képessége. (33. ábra D) A minimál körülmények hifaképzést gátló hatását, csak a vitamin koncentráció megemelésével sikerült kicsit ellensúlyozni (33. ábra F). Bár még így is jelentősen elmaradt a hifák hossza a 7-1 vad típusú törzshöz viszonyítva (33. ábra E).



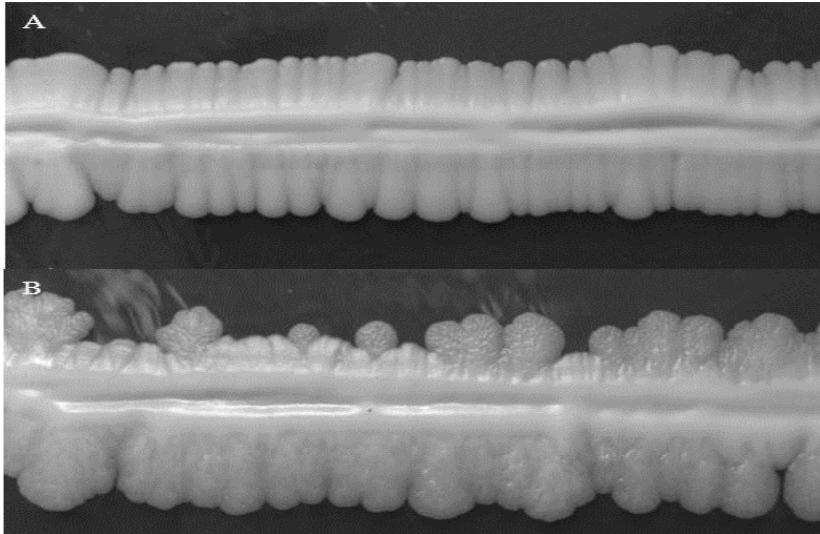
33. ábra A dimorf átváltás vizsgálata különböző körülmények között. **A)** és **B)** YPA-n 30°C-on 10 napig inkubálva; **C)** és **D)** EMMA táptalajon 30°C-on 7 napig inkubálva; **E)** és **F)** EMMA +10X vitamin koncentrációjú táptalajon

30°C-on 7 napig inkubálva. **G**), **H**) és **K**) 5% CO₂ atmoszférában 30°C-on 7 napig inkubálva YPA-n; **I**) és **J**) YPL+ 50% FBS –ban 37°C-on; **L**) YPL + 5% pepton táptalajon 37°C-on inkubálva 7 napig. Az **A**), **C**), **E**), **G**) ábrák a 7-1 vad típusú sejtek, míg a **B**), **D**), **F**), **H**), **K**), **I**), **J**), **L**) ábrákon a *pkal* mutáns sejteji láthatók. (A \longleftrightarrow -nyíl a szeptumokat, a \rightarrow -nyíl a hifakezdeményeket, míg a \lrcorner - nyíl a vakuólumokat mutatja) A mikroszkópos ábrákat 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

Vizsgálataink a szén-dioxid atmoszférában történő hifáztatást is magába foglalták, ugyanis szakirodalmi adatok alapján a patogén gombák képesek a gazdaszervezeten belül, az emelkedett CO₂ szintre dimorf átváltással válaszolni (Bahn és Mühlischlegel, 2006). Továbbá kíváncsiak voltunk, hogy a *Sch. japonicus* vajon e téren is mutat-e hasonlóságot a patogénekhez, illetve a mutáció miként befolyásolja e gáz érzékelését. Azt tapasztaltuk, hogy 5% CO₂ hatására a 7-1-es vad típus képes érzékelni a CO₂-t de a táptalaj felszínén képezte a hifákat, ellentétben az eddig megszokott agar inváziós képpel szemben (33. ábra G). Ugyanakkor a mutáns sejtek hasonló körülmények között teljesen képtelenek voltak hifa létrehozására. (33. ábra H) A 33. K ábra azonban arra is rávilágít, hogy a sejtek képesek voltak a morfológiai átváltásra, s inkább a hifák megnyúlása gátlódott. Vizsgálataink azt is megmutatták, hogy a *pkal*Δ sejtek megőrizték az FBS érzékelése valódi hifa (33. ábra I) és pszeudohifa (33. ábra J) létrehozásának képességét, illetve az erős vakuolizációt (33. ábra L).

A morfológiai átváltást megvizsgáltuk más körülmények között is, például 8% glükóz jelenlétében. Amint a 34. ábra mutatja, a magasabb cukorkoncentrációra is másképpen reagált a mutáns sejt. Bár képes volt hifák

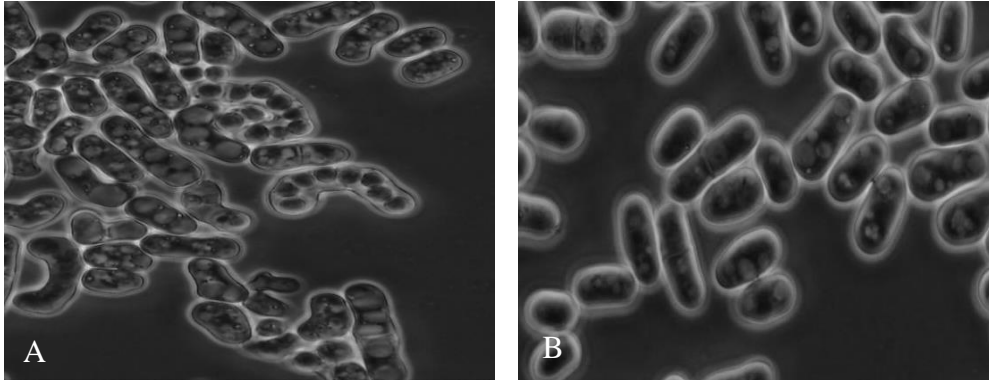
létrehozására, azok inkább „érdesebb” felületű pszeudohifák voltak (34. ábra B), szemben a vad típusú törzs valódi hifáival (34. ábra A).



34. ábra Hifa képzés tesztelése 8%-os glükóz tartalmú YEA-n. A csészék 30°C-on inkubálódtak 7 napig. **A)** 7-1 kontroll sejtek; **B)** *pkal* mutáns sejtek.

IV.5.3. Spórázás vizsgálata

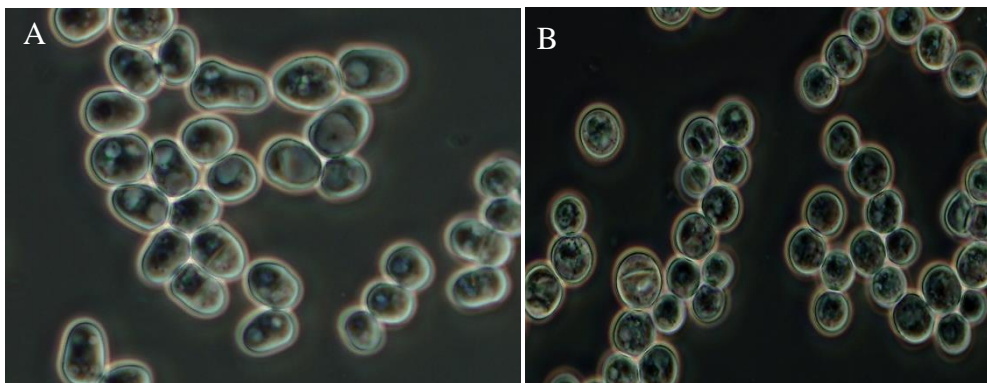
Fenotípusos vizsgálatok során feltűnt, hogy a mutáns sokkal gyakrabban képez spórát, mint a vad típusú törzs. Azaz, már 1-2 nap után is képes volt aszkuszok létrehozására mind komplett, mind minimál táptalajon (35. ábra A). Mivel a hasadó élesztőnél a sporuláció csak speciális körülmények között, nitrogén éhezésre szokott beindulni, így a fenti eredmények azt sugallják, hogy a *pkal* gén hiányában a sejtek nitrogén érzékelése módosult.



35. ábra A *pkal* mutáns törzs spórázása minimál táptalajon. **A)** *pkal* mutáns **B)** 7-1 vad típus kontroll. Az ábrákat 100x nagyítású objektív használatával fényképeztük.

Így a *pkal* mutáns törzs spóráképzési hajlama fokozottabb volt a kontroll vad típushoz képest, amit a nagyszámú aszkusz jelenléte igazolt. (35. ábra A).

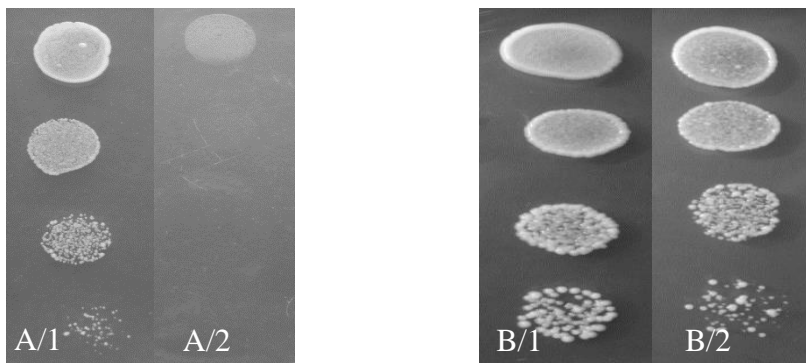
A mutáns sejtek hasonlóan viselkedtek folyékony táptalajban is, ahol a komplett tápfolyadékban (YPL) 30°C-on a *pkal* mutáns teljesen lekerekedett, az éhezéssel emlékeztető sejtalakot produkált. (36. ábra B) Minimál tápfolyadékban (EMML) 30°C-on 1 nap után nagyon nagy hányadban aszkuszok és szabad spórák jelenléte volt tapasztalható.



36. ábra Komplettn tápfolyadékban történő sejtalak összehasonlítás. **A)** 7-1 YPL 30°C **B)** *pkal* mutáns YPL 30°C.

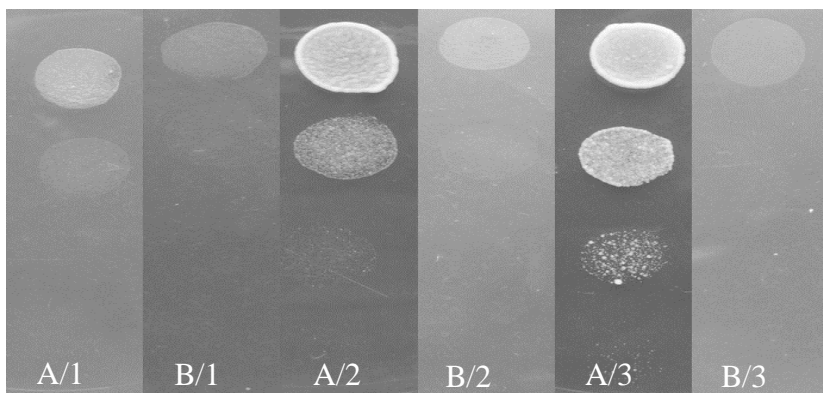
IV.5.4 Stressz vizsgálatok

A *pka1* mutáns törzs stressztűrését is megvizsgáltuk, mely az ozmotikus stressz hatásokat, kémiai, valamint a sótűrés elemzte. Azt tapasztaltuk, hogy a 0,75M-os KCl koncentrációra a *pka1* mutáns érzékenyebb volt (37. ábra A2), 1M-os koncentráció esetén pedig képtelenek voltak a sejtek az osztódásra (adat nem látható). A vizsgálatokat 25-30-37°C-on is elvégeztük, s minden hőmérsékleten hasonló eredményt kaptunk.



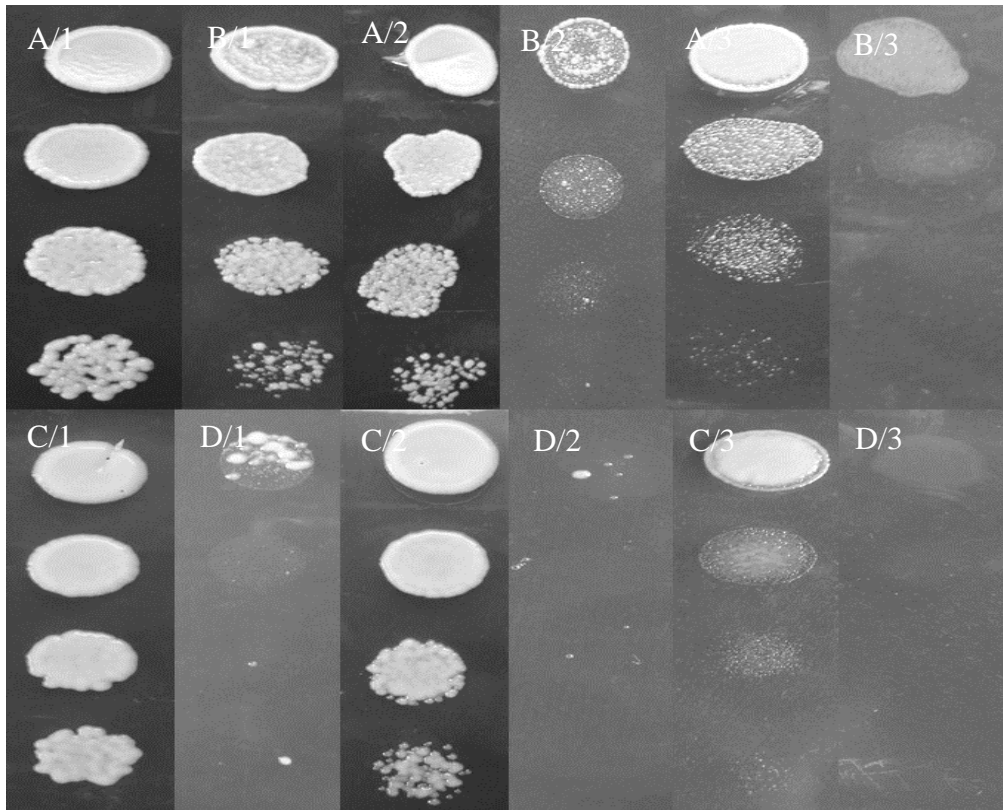
37. ábra KCl hatásának vizsgálata. 7-1 [A1/B1] és *pka1* Δ [A2/B2] csepegtetés. Az **A)** ábra 0,75M-os KCl-os YPA 37°C-on; **B)** ábra YPA 37°C-on. A felső OD₅₉₅ = 0,2 sejtkoncentrációt tartalmazott, az alatta levő sorokban pedig 10x, 100x valamint, 1000x hígítás látható.

A sejtek érzékenységét 5mM és 7mM koffein tartalmú táptalajon is teszteltük, és azt tapasztaltuk, hogy a *pka1* mutáns rendkívül érzékeny volt minden hőmérsékleten a koffeinre. (38. ábra)



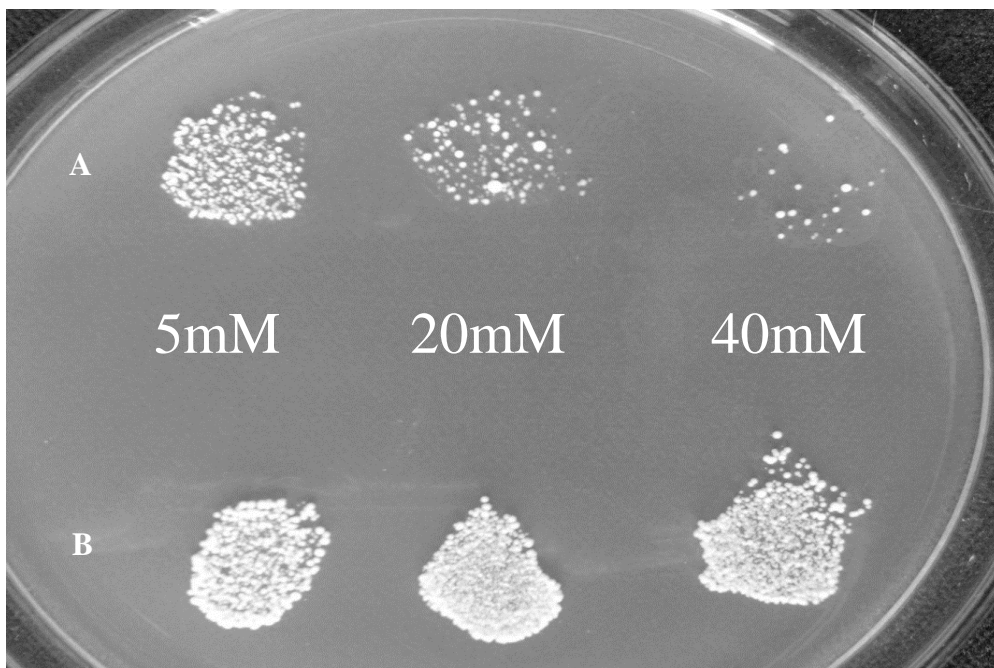
38. ábra 5mM koffein hatása a sejtek szaporodására. **A)** vad típusú sejtek, **B)** *pka1* mutáns sejtek. Az 1-3 számok a hőmérséklet emelkedését jelzik: 25, 30 és 37°C egyenként. A felső sor OD₅₉₅= 0,2 ezután 10x, 100x valamint, 1000x higítás látható. A csészék 2 napig voltak inkubálva az említett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

Ozmotikus stressz vizsgálatokat a glükóz koncentráció megemelésével végeztünk. A koncentrációk 0,2M-tól 2,22M-ig terjedtek (ez 5-40 tömegszázaléknak felel meg) melyekkel párhuzamosan a hőmérséklet (25-37°C) és a pH (4-8) is tesztelve volt. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a mutánsunk a nagyobb cukor koncentrációkra (20-40%) minden hőmérsékleten és pH-n érzékenyebben viselkedett, mint a kontroll vad típus. Ez a legszembetűnőbb 37°C-on pH4-en volt tapasztalható. (39. ábra D) A 39. ábra A és B képein az is látható, hogy a *pka1* mutáns semleges pH-n is hasonló módon viselkedett, mint azt pH 4-en láthattuk.



39. ábra Glükóz koncentráció hatásának vizsgálata csepegtetéssel. **A)** és **C)** vad típusú [7-1] sejtek, **B)** és **D)** *pka1* mutáns sejtek. **A)** és **B)** csészék pH 7; **C)** és **D)** csészék pH 4 -re voltak beállítva. Az 1-3 számok a glükóz koncentrációkat jelölik: 20, 30 és 40% -nak megfelelően. A felső sor OD₅₉₅= 0,2 ezután 10x, 100x valamint, 1000x hígítás látható. A csészék 37°C-on voltak inkubálva 2 napig.

A stressz vizsgálatok során az oxidatív stressz hatását is tanulmányoztuk a mutánsunkon. Azt tapasztaltuk, hogy 40mM H₂O₂ -ra már jelentős érzékenységet mutatott a mutánsunk, míg a vad típus esetében nem láttunk változást. (40. ábra) Ez az eredmény összhangban van más dimorfizmust mutató gombák oxidatív stressz érzékenységével. (Fuller és Rhodes, 2012)



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

IV.5.5 A *pka1* által szabályzott gének azonosítása

IV.5.5.1 RNS szekvenálás *pka1* mutánsból

Mivel a mutáns törzsünk pleiotróp fenotípust mutatott, ezért szeretettük volna meghatározni a *pka1* gén által regulált géneket, azaz a mutáns sejt transzkripciós mintázatát. Tanszékünkön ezt RNS szekvenálás módszer segítségével végeztük el, mellyel meghatároztuk a *pka1* gén mutációjának a transzkriptomra gyakorolt hatását.

A kísérlet során a vad típusú és *pka1* mutáns törzs, élesztő állapotú sejtjeiből totál RNS-t izoláltunk. Az RNS minták szekvenálását, valamint

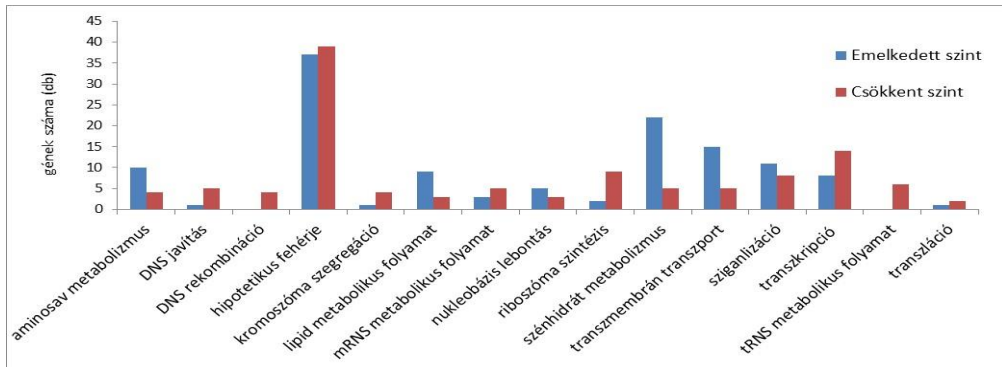
kiértékelését követően megállapítottuk, hogy összesen 1986 gén mRNS szintje változott meg szignifikánsan a mutáns törzsben a vad típushoz viszonyítva. A mutáció következtében 979 gén expressziója emelkedett, míg 917 esetben tapasztaltunk csökkent transzkriptum szintet. Szükséges megemlíteni, hogy e gének közül a kisebb mértékű változást mutatókat nem, csak a \log_2 fold 2 vagy ennél nagyobb (tehát a 4x vagy ennél nagyobb) változásokat vettük figyelembe a továbbiakban. Így 366 génnek állapítottuk meg a funkcióját a www.pombase.org GO funkcionális kategóriák szerint. (41. ábra) (Függelék 2. táblázat)

Gene name	value 1	value 2	log2 (fold_change)
SJAG_02133 aminoacid permease	0	1,0132	
SJAG_06576 hypothetical protein	0,177832	2,2703	-3,674296091
SJAG_04575 meiotic chromosome segregation protein Meu6	1,4768	11,8061	-2,998986104
SJAG_04312 AGC/PKA protein kinase Pka1	27,7707	218,011	-2,972765482
SJAG_02947 general amino acid permease GAP1	10,7904	65,0844	-2,592563441
SJAG_03508 eukaryotic protein implicated in cell cycle regulation	42,2909	232,748	-2,460349603
SJAG_02126 trichothecene 3-O-acetyltransferase	1,15169	6,16883	-2,42124445
SJAG_04068 high-affinity fructose transporter ght6	114,034	16,0335	2,830302743
SJAG_02988 hypothetical protein // ThiJ domain-containing protein	121,352	15,4163	2,976669429
SJAG_04458 NAD binding dehydrogenase	2752,74	263,992	3,382302236
SJAG_03203 hypothetical protein	406,375	30,2267	3,748916264
SJAG_03644 glycerophosphodiester transporter	32,3747	2,03101	3,994597576
SJAG_00110 But2 family protein	107,797	4,87967	4,465389633
SJAG_01096 amino acid permease	10,7493	0,428988	4,647161612

41. ábra A *pka1* RNS szekvenálás adatainak részlete. Az ábrán a legszignifikánsabb változások vannak kiemelve. Value_1 a *pka1* mutáns adatsora, value_2 a 7-1 vad típusú sejt adatsora.

A funkcionális kategóriák alapján elmondható, hogy a szénhidrát anyagcsere, a jelátviteli folyamatok valamint a transzmembrán transzportért felelős gének szintje változott leginkább. Nagyon nagy mennyiségben szabályozódtak a feltételezett funkciójú fehérjék is. Érdekes módon, ezek közül nagyon sokan *Sch. japonicus* specifikusak, melyeknek vizsgálata fontos és érdekes lenne e ősi, kevésbé ismert élesztő szempontjából. Másik érdekes adat, hogy a *pka1* mutánsban a *pka1p* partnere, a *cgs1* fehérjét

kódoló gén mRNS szintje jelentősen megemelkedett. (Függelék 2. táblázat).
(42. ábra)



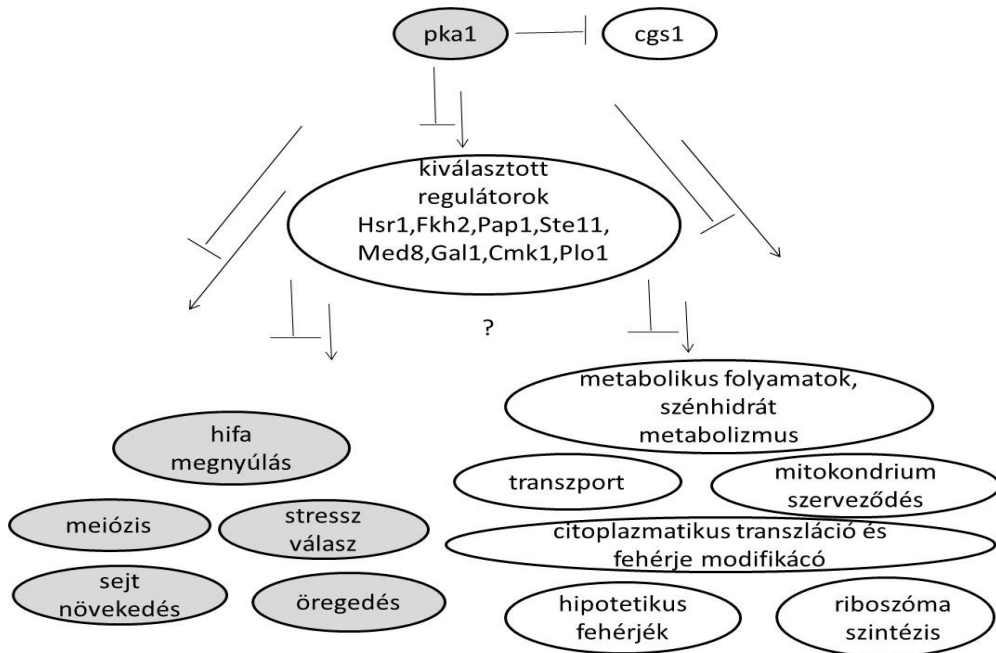
42. ábra *pka1* mutáns által regulált fontosabb folyamatok.

A *pka1* által befolyásolt gének között megnéztük, milyen regulátor funkciójú gének (kinázok, foszfatázok, transzkripciós regulátorok) vannak. Amint a következő táblázat is mutatja, több ilyen gént is találtunk, így a *pka1* feltehetően részben e regulátorokon keresztül fejt ki hatását. (16. táblázat)

16. táblázat: a *pka1* gén által szabályzott regulátor funkciójú gének

Kozmid név	Funkció	mRNS szint változás
SJAG_03388	Hsr1 transzkripciós faktor	+
SJAG_00995	transzkripciós faktor TFIIH komplex Rad15 alegysége	+
SJAG_03354	transzkripciós faktor TFIIIC komplexhez asszociált sfc1 alegység	-
SJAG_04813	fork head transzkripciós faktor Fkh2	-
SJAG_03206	transzkripciós faktor TFIIH komplex ERCC-3 alegysége	-
SJAG_03622	mediátor jomplex Med8 alegysége	-
SJAG_04036	transzkripciós faktor Pap1/Caf3	-
SJAG_03384	STE/STE11 protein kináz	+
SJAG_03880	szénhidrát kináz	+
SJAG_02950	galaktokináz Gal1	+
SJAG_02796	piruvát kináz	+
SJAG_02858	CAMK/CAMK1 protein kináz Cmk1	+
SJAG_01245	cAMP-függő protein kináz szabályzó alegysége Cgs1	+
SJAG_02626	protein kináz inhibitor	+
SJAG_04882	ribóz foszfát pirofoszfokináz	-
SJAG_01805	PLK protein kináz Plo1	-
SJAG_02567	foszfoprotein foszfatáz	+
SJAG_01241	alkalikus foszfatáz	+
SJAG_04579	nukleotid-cukor foszfatáz	+
SJAG_00711	sav foszfatáz	-
SJAG_01667	kettős specifikus foszfatáz Stp1	-
SJAG_04939	bisz (5'-adenozil)-trifoszfatáz	-
SJAG_01286	CTD foszfatáz Fcp1	-

Ennek figyelembevételével, elmondható, hogy a *pka1* gén egy sokoldalú regulátor gén, több száz más gén működését befolyásolja közvetlenül vagy közvetetten. E gének a legkülönbözőbb folyamatokban vesznek részt, amint az alábbi sematikus ábra is mutatja. (43. ábra)



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

IV.5.5.2 A *pka1* szerepének kiderítése a morfológiai átváltásban

Mivel az IV.5.2 fejezetben látható, hogy a *pka1* mutáns törzs hifái rövidebbek, mint a vad típusú sejteké, ezért szerettük volna kideríteni, hogy a target gének közül, melyek lehetnek kapcsolatosak a morfológiai átváltással. Ezért megkerestük az irodalomból ismert, dimorfizmushoz köthető *Candida* gének homológjait az RNS szekvenálási adatainkban. Több gént is

megtaláltunk, bár ezek száma az összeshez képest igen kevés (17. táblázat). De feltehető, hogy az *Sch. japonicus*-ban is szükségesek a dimorfizmushoz, s a *pka1* által szabályozódnak.

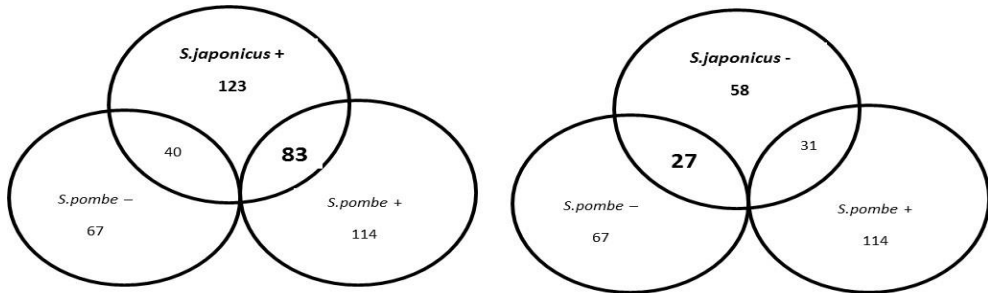
17. táblázat: a *C.albicans* dimorf gének homológjai *Sch. japonicus*-ban

Fonals növekedés során kifejeződő gének a <i>C.albicans</i> -ban	Homológ gének a <i>Sch.japonicus</i> -ban	Funkció	mRNS szint változás a <i>pka1Δ</i> -törzsben
<i>BCY1</i>	SJAG_01245 <i>Cgs1</i>	cAMP-függő protein kináz szabályzó alegység	+
<i>FKH2</i>	SJAG_04813 <i>Fkh2</i>	“fork head” transzkripciósfaktor	-
<i>GAP1</i>	SJAG_04637 <i>Gap1</i>	általános aminosav permeáz	+
	SJAG_02947 <i>Gap1</i>		-
	SJAG_01998 <i>Gap1</i>		+
	SJAG_02946 <i>Gap1</i>		-
<i>ERG1</i>	SJAG_00370 <i>Erg1</i>	squalén monooxigenáz	+
<i>ECM33</i>	SJAG_00340 <i>Ecm33</i>	sejtfal fehérje	+
<i>GRE2</i>	SJAG_02960	flavonol reductáz/cinnamoyl-CoA reductáz fehérje	+
<i>ALD5</i>	SJAG_03786	aldehid dehidrogenáz	+
<i>YMR91</i>	SJAG_00366	gomba fehérje	+
<i>HSP12</i>	SJAG_00223	hsp9-szerű fehérje	+
<i>PHR1</i>	SJAG_1290 <i>Gas1</i>	sejtfal fehérje	+
<i>ARO10</i>	SJAG_02734	piruvát dekarboxiláz	+
<i>PST1</i>	SJAG_02697 <i>Uhp1</i>	ubiquitinált hsp szerű fehérje	+

IV.5.5.3 *pka1* target gének összehasonlítása *Sch. pombe* és *Sch. japonicus* fajokban

Összehasonlítást végeztünk a legközelebbi rokon faj (*Sch. pombe*) *pka1* mutáns RNS profiljának adataival is, annak kiderítésére, hogy a *pka1* target génei mennyire változtak meg a két faj elválása óta. Érdekes módon, a *Sch. pombe* *pka1* target gének többsége megtalálható volt, az eredeti

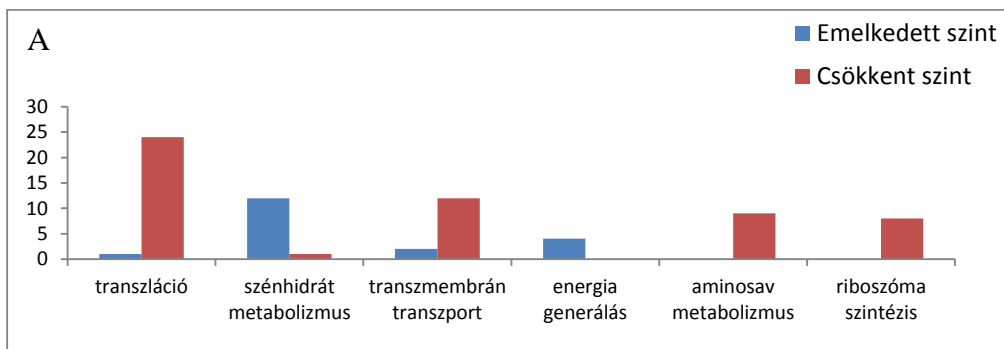
táblázatunkban, amely a kismértékben módosult, de szignifikáns különbséget mutató RNS szintbeli változásokat is tartalmazta. De ha a jelentős változást mutató gének csoportját vizsgáljuk, akkor is sok azonos *pka1* target gént találtunk a két faj között. (44. ábra)



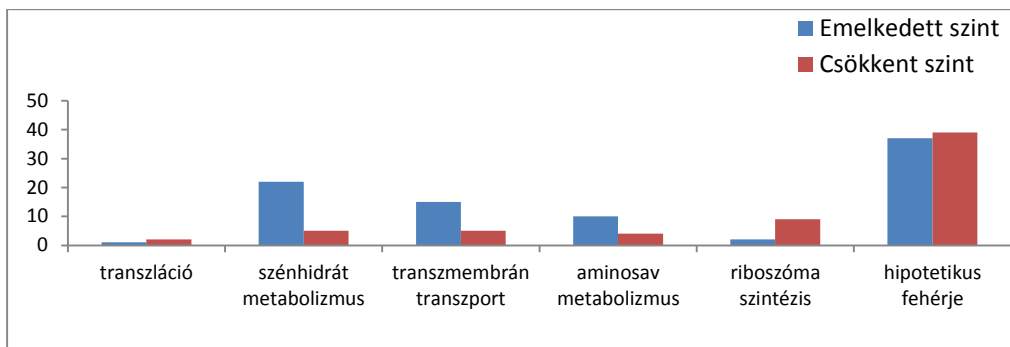
44. ábra A *pka1p* által szabályzott gének száma. [+] -al jelölve az emelkedett szintet és [-] a csökkent szintű géneket.

Ugyanakkor az is szembeűnő, hogy bár a gének egy részét azonos módon szabályozzák, találhatók voltak olyan gének is, melyek esetén ellentétes irányú változást találtunk a két fajban. (44. ábra)

A két faj *pka1* target géneinek funkcióit tekintve, pedig megállapítható, hogy sok azonos funkciójú gén volt a transzkripciós vizsgálatokban. (45. ábra) Így feltehetően a két fajban többnyire azonos folyamatokat, és számos azonos gént regulál a *pka1*.



B



45. ábra A *Sch. pombe* és *Sch. japonicus* *pka1* gén által közvetlenül vagy közvetetten szabályzott gének funkciói. **A)** *Sch. pombe* *pka1* target gének; **B)** *Sch. japonicus* *pka1* target gének.

V. Diszkusszió

A dimorfizmus a patogén gombák egyik fontos jellemzője, mely szoros kapcsolatot mutat a virulenciájukkal. Munkánk célja a dimorfizmus vizsgálata volt a *Sch. japonicus* modellszervezetben, mely a *Schizosaccharomycetales* genusz egyedi tagjaként, dimorfizmust mutat. Első lépésként az élesztő-hifa átváltást befolyásoló környezeti körülmények hatását vizsgáltuk klasszikus genetikai, és mikrobiológiai kísérletekkel. Továbbá célunk volt, hogy a dimorfizmus molekuláris hátterét, a szabályzó jelátviteli útvonalakat azonosítsuk.

A klasszikus kísérletek során a szilárd és folyékony tápfolyadékban vizsgáltunk különböző környezeti körülményeket. Számos környezeti körülményt találtunk, mely befolyásolja a dimorfizmust. Az egyik ilyen körülmény a hőmérséklet, melynek indukáló hatása a dimorfizmust mutató gombák körében egy központi faktor. A mi esetünkben a *Sch. japonicus* morfológiai átváltását a hőmérséklet emelkedése váltotta ki (10. ábra), ellentétben például a *Hystoplasma capsulatum*-nál tapasztaltakkal (Maresca 1989). További környezeti körülmény tekintetében az alacsony pH (pH4) kifejezetten elősegítette a *Sch. japonicus* hifás átváltását (9. ábra) ellentétben a *Y. lipolytica*-nál és a *C. albicans*-nál tapasztaltakkal (Ruiz-Herrera és Sentadreu, 2002; Vylkova és mtsai, 2011). Az alacsony pH által indukált fonalas növekedés tekintetében a *Sch. japonicus* inkább a *C. neoformans*-hoz és az *U. maydis*-hoz hasonlít. (Ruiz-Herrera és mtsai, 1995; Wickes, 1996)

A tápanyag minősége és koncentrációja szintén fontos szerepet játszó faktor a dimorfizmusban. Megállapítottuk, hogy a szilárd táptalajon a *Sch. japonicus* hifaképzése nem csak az éhezés miatt indulhat meg, mint azt korábban feltételezték (Sipiczki, 1998), hanem pl. a pepton egy bizonyos koncentrációjának a jelenléte, is elősegítheti a folyamatot. (11. ábra) A tápanyaghoz köthető vizsgálatokat végeztünk minimál táptalajon is, ahol a

vitaminok, és a nitrogénforrás típusát változtattuk. Megállapítottuk, hogy a megvizsgált aminosavak közül az arginin volt a legnagyobb mértékben indukáló hatással a hifázásra. (13-14 ábrák) De a vitamin koncentráció növelése és a hifás átváltás mértéke is pozitív korrelácót mutatott. (16. ábra) Nukleobázisokkal végzett kísérleteink során viszont azt az eredményt kaptuk, hogy adenin jelenléte megakadályozta a hifás átalakulást (15. ábra). Fontos, hogy a purin bázisok gátló hatása nem igazán ismert a szakirodalomban. Ráadásul a *Candida albicans*-nál az adenin jelenléte elősegíti a white és opaque állapot közötti átváltást (Huang, 2012). Az *Aspergillus nidulans* esetében viszont a hisHF transzkripcióját gátolja, ami közvetetten befolyásolhatja a dimorf átváltást (Valerius, 2001). *Sch. japonicus* esetében viszont közvetlenül a hifázást gátolta, még több heti inkubáció után is stabilan élesztő állapotú sejteket láttunk. Ez a felfedezés hasznos lehet a dimorf patogén gombák elleni védekezésben, ugyanis e gombák fertőző képessége a dimorf váltáson alapszik. Mivel nem ismerjük a pontos gátló hatást, illetve mely target gének érintettek, ezért az adenin hatásmechanizmusának vizsgálatára további kísérletek szükségesek.

A korábbi kísérleti adatok azt mutatták, hogy a *Sch. japonicus* kizárólag szilárd táptalajon képez csak hifát (Sipiczki, 1998a). Kísérleti adataink alapján azonban találtunk olyan körülményeket, mely során folyékony táptalajban is képes volt fonalas formában szaporodni. Az egyik körülmény a nagy ozmotikus nyomás hatása volt, melyet 1M-os szorbitollal idéztünk elő. (17. ábra) Ez megegyezik azon irodalmi adatokkal, melyek szerint a fonalas növekedés indukálható ozmotikus stressz hatására, melyek a MAPK szignalizációval vannak összefüggésben (Duran és mtsai, 2010). Ilyen a magas ozmotikus glicerol válasz (HOG) jelátviteli út mely a hiperozmotikus stressz érzékelésért felelős. Bizonyított tény, hogy az eltérő funkciójó MAPK útvonalak egymással kommunikálnak, ami

megmagyarázza, hogy egy HOG útvonal miért képes aktiválni a fonalas növekedés útvonalát (Davenport, 1999). A másik körülmény a magzati borjú vérszérum (FBS) hifázást indukáló hatása (18-19 ábrák), ami egyben az egyik legmeglepőbb eredményünk volt. E nem patogén szervezet szérum hatására fonalasan növekedett, ami így emlékeztet a patogén gombák szérumra adott válaszreakciójára (Sánchez-Martinez és Pérez-Martin, 2001). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *Sch. japonicus* nem csak egy egyszerű dimorfizmust mutató élesztő, hanem egy nagyszerű modell szervezetnek ígérkezik, melyen a fent tapasztalt hasonlóságok fényében a patogének dimorfizmusa is jobb hatásfokkal tanulmányozható.

Bár a fent említett környezeti körülményekre adott hasonló válaszreakciók nagyon ígéretesek, szükséges viszont, hogy a *Sch. japonicus* és a patogén gombák jelátviteli folyamatainak összehasonlítása, mivel például ezek a jelfolyamatok felelősek a patogén gombák fertőzőképességéért (D'Souza és mtsai, 2001; Fuller és Rhodes, 2012). Ennek tudatában meghatároztuk, hogy mely gének vesznek részt az élesztő-hifa átváltásban. (21. ábra) Azt tapasztaltuk, hogy a *Sch. japonicus* 2903 gén szintje szignifikánsan változott, de ezekből csak 229 gén az, melyek kifejeződési szintje 2x-es, vagy ennél magasabb, illetve $\frac{1}{2}$ vagy annál alacsonyabb volt. Ez azt jelenti, hogy valószínűleg ez a 229 db gén, mely valamilyen módon közvetlenül is részt vesz az élesztő-hifa átalakulás molekuláris folyamataiban. Ezeket az eredményeket bioinformatikai programokkal összehasonlítottuk a *C. albicans* humán patogén adataival és azt tapasztaltuk, hogy a *C. albicans* dimorfizmusát szabályzó főbb útvonalak génjei megtalálhatóak a távoli rokon *Sch. japonicus*-ban is (22. ábra). Ezen gének tehát olyan résztvevői a gombák dimorfizmusának, melyek feltehetően fajtól függetlenek. Fontos hangsúlyozni, hogy bár a szekvenálási adatok szignifikánsak voltak, ugyanakkor a gének pontos szerepének meghatározása,

és az útvonal validálása csak a gének további mutációs analízise után történhet meg. Eredményeink azt is mutatják, hogy a morfológiai átváltás igen komplex folyamat, hiszen számos különböző funkciójú gén vesz részt a kialakításában. (21. ábra)

Ezután, a szignifikánsan változott génekkel bioinformatikai összehasonlítást végeztünk, majd kiválasztottunk egy, a patogén gombák dimorfizmusában központi szerepet játszó regulátor gént, a protein kináz A génjét. Ezt töröltük a *Sch. japonicus* kromoszómájáról (24-28. ábrák), majd a mutánst számos környezeti körülmény mellett vizsgáltuk. Ellentétben számos gombával (Toda és mtsai, 1987; Sonneborn és mtsai, 2000) a gén hiánya életképes fenotípust eredményezett, hasonlóan a *Sch. pombe*-hoz (Kim és mtsai, 2010). Megállapítottuk továbbá, hogy a gén deléciója, ellentétben a patogén gombáknál tapasztaltakkal, nem eliminálta teljesen az élesztő-hifa átváltást. Azt tapasztaltuk, hogy bár a hifák a *pka1* mutánsban is megjelentek, de azok rövidebbek voltak. Azaz, nem az átváltás mechanizmusa, hanem inkább a hifák megnyúlása gátlódik a *pka1Δ* mutánsban. (33. A,B,G,H és K ábrák) A *pka1* gén sokoldalú szerepét mutatja, hogy a deléciója hatására stressz, pH, hőmérséklet érzékenységet és a sejtek gyorsabb öregedését is tapasztaltuk (37-40 ábrák), ami e regulátor gén sokoldalúságát mutatja. A stressz érzékelés elsődlegesen a stressz aktivált protein kinázokon keresztül valósul meg, melyek tagjai a MAP kinázoknak (Smith, 2010). A MAP kináz és PKA jelpálya között bizonyítottan kommunikáció zajlik, mely így megmagyarázná, hogy az ozmotikus tolerancia miért kisebb a *pka1* mutánsunkban. Tapasztaltuk továbbá, hogy a mutáns sejtek rendkívül érzékenyek voltak az oxidatív stresszre. (40. ábra) A fenti eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a stressz toleranciában mutatott érzékenység hasonló volt más gomba fajok PKA mutáns törzsénél tapasztaltakhoz (Giacometti és mtsai, 2009, Fuller és Rhodes, 2012).

Mivel az irodalomban nem kellő részletességgel ismert a PKA út szignalizációja, ezért transzkriptóm analízist végeztünk, hogy pontos képet kapjunk a mutáció hatására bekövetkezett génexpressziós változásokról. Az analízis eredményeként elmondhatjuk, hogy elsődlegesen a transzmembrán transzport, a jelátvitel és a szénhidrát anyagcsere génjeinek szintje változott legszignifikánsabban, valamint nagyszámú *Sch. japonicus* specifikus hipotetikus fehérje, melyek funkciói még nem ismertek (42. ábra). Az elemzések alapján azt is elmondhatjuk, hogy modell szervezetünk dimorfizmusának molekuláris hálózata, és szabályzása hasonlóságot mutat a *C. albicans*, *C. neoformans*, és *U. maydis*-hoz illetve nyilvánvalóan a legközelebbi rokonéhoz, a *Sch. pombe*-hoz. Az értékek összehasonlítása alapján azt tapasztaltuk, hogy a MAPK jelpálya és PKA útvonal elemei hasonlóan szabályozzák a dimorfizmust, mint a *C. albicans*-ban. Kutatási eredményeink megerősítik a már mások által leírt eredményeket, miszerint a PKA és MAPK útvonalak közötti kommunikáció zajlik. (Sengupta és mtsai, 2007) Esetünkben ez a *pkal* és *stell* géneket jelentette. (22. ábra) Ugyanakkor a *Sch. japonicus*-nál úgy tűnik, hogy az effektor enzim, a PKA szintje csökkenést mutatott, aminek az oka valószínűleg a visszacsatolási rendszer eltérő működése, illetve a fázisváltás target génejeivel magyarázható.

Összehasonlítást végeztünk a legközelebbi rokon faj, a *Sch. pombe* *pkal* mutánsának transzkriptóm adataival. A 44. ábrán jól látható, hogy a *pkal* targetgénjei igen hasonlóak a két fajban. Bár vannak azért különbségek is, illetve ellentétes módon szabályzott gének. Ez feltehetően az eltérő élettér és a filogenetikai elválás óta eltelt idő miatt alakulhatott így.

Sikerült azonosítani azon géneket is, amelyek a dimorfizmushoz köthetők (17. táblázat).

Az eddigi eredmények azt támasztják alá, hogy a *Sch. japonicus* igen egyedi tulajdonságokkal rendelkezik. Fontos hangsúlyozni, hogy további vizsgálatok szükségesek, hogy nagyobb felbontású képet kaphassunk a szabályzásról. Ezek az ismeretek lehetőséget adhatnak a patogén gombák elleni védekezés egy másik szemszögéből történő megközelítéshez. Mivel a PKA jelátvitel számos patogén virulenciájához szükséges, az útvonal célzott megszakítása, gyengítése különböző gyógyszerekkel, terápiákkal igen hatékony lehet e gombák elleni védekezésben. Mindezek mellett a számos PKA vizsgálat azt eredményezte, hogy olyan inihibitor molekulákat fedeztek fel, mely például az emlős sejtosztódást is gátolta, ami rendkívüli fontosságú lehet egy daganatos elváltozás kezelésében is. (Tortora, 2002) Célpontok lehetnek a PKA által szabályzott gének, melyek nagyszámban jelenleg ismeretlen funkcióval rendelkeznek. Így az eddigi eredményeink, valamint az RNS szekvenálási adatok további elemzése alapján lehetséges, hogy ezek hozzájárulhatnak új „gyógyszer célpontok” felfedezéséhez, illetve ezek alapján új gyógyszerek fejlesztéséhez, melyek hatékonyabb védelmet biztosíthatnak a dimorfizmust mutató patogén gombák ellen.

VI. Összefoglalás

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

- megállapítottuk, hogy a *Sch. japonicus* szilárd táptalajon, fonalas formába történő átváltása erősen függ a külső körülményektől. (9-16. ábrák) Sikeresen azonosítottuk a morfológiai átváltást elősegítő és gátló körülményeket. Megállapítottuk, hogy e körülmények tekintetében csak részben hasonlít a *C. albicans*-ra.

- meghatároztuk, hogy a *Sch. japonicus* – FBS valamint 1M-os szorbitol hatására - képes folyadékban is fonalas formában szaporodni, (17-20. ábrák) mely nagyon hasznos lehet a dimorfizmus további molekuláris vizsgálatában.

- sikerült a hifás állapotú sejtekből RNS-t izolálni, ezután pedig RNS szekvenálás módszerét alkalmazva elemzést készítettünk, melyből meghatároztuk a hifás állapotban expresszálandó géneket és ezek szintjét. (21. ábra és függelék 1. táblázat) Ennek során kiderítettük, hogy a *Sch. japonicus* miceliális növekedése is igen komplex folyamat, hiszen számos különböző funkcionális kategóriába tartozó gén működése módosult. (21. ábra)

- a *C. albicans* dimorf átváltásához szükséges génei alapján megszerkesztettük a *Sch. japonicus* feltételezett, élesztő-hifa átváltásért felelős szignalizációs hálózatát (22. ábra)

- bioinformatikai összehasonlítások után kiválasztottunk egy a dimorfizmusban feltehetően szerepet játszó központi regulátor gént (*pka1*),

amit töröltünk a *Sch. japonicus* kromoszómájáról. (24-28. ábrák) E munka során kapott eredmények arra is felhívták a figyelmet, hogy az *Sch. japonicus* homológ rekombináció tekintetében valószínűleg jobban hasonlít a fonalas őseihez, és a fonalas patogén gombákhoz, mint a közeli rokon, fonalas átváltásra képtelen rokonához a *Sch. pombe*-hoz. (29-30. ábrák)

- karakterizáltuk a *pka1* mutánst, melynek hifás formába történő átváltása időben lassabb volt, s rövidebb hifákat eredményezett. A mutáns törzs fenotípusos vizsgálata rávilágított arra is, hogy a *pka1* gén milyen sokoldalú regulátor. Hiszen a mutáns érzékenységet mutatott különböző stresszfaktorokra, sejtmérete rövidebbnek bizonyult, és aktívan spórázó fenotípus jellemezte a vad típushoz képest (32-40. ábrák)

- a *pka1* mutánsból RNS-t izoláltunk, hogy a *pka1* deléció okozta pleiotróp hatásról és a *pka1* által szabályzott génekről részletesebb képet kaphassunk. Az elemzés segítségével megszerkesztettük a *pka1* szignalizáció feltételezett útvonatát, meghatároztuk a *pka1* lehetséges cél génjeit, és ezeket az eredményeket összehasonlítottuk a közeli rokon *Sch. pombe*-val. (41-45. ábrák)

Summary

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

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

First, we studied the effects of environmental factors on dimorphism. Several external conditions were investigated both on solid and liquid media. Our results showed that high osmotic pressure, which is involved in MAPK signalling pathway (Duran et al, 2010), and poor conditions could cause mycelial growth. However, the strongest inducer was the Fetal Bovine Serum. Its positive effect could be hampered by heat and was dependent on pH, temperature and concentration of the serum. Generally, the uninduced and induced mycelial growth of *Sch. japonicus* could be improved by lower external pH. This feature of the cells resembled *C. neoformans* and *U. maydis* (Wickes, 1996; Ruiz-Herrera et al, 1995) rather than *Y. lipolytica* and *C. albicans* (Ruiz-Herrera and Sentadreu, 2002; Vylkova, 2011). Higher temperature also increased the morphological switch, unlike *H. capsulatum* (Maresca and Kobayashi, 1989) and similarly to *C. albicans* (Soll et al, 2003). Peptone and certain amino acids also had rather a positive effect on hyphae production. Now, our results also revealed that nucleobases, such as adenine and guanine, inhibited mycelial growth, in contrast to *C. albicans*, where the presence of adenine promoted the switch between white and opaque forms (Huang, 2012).

Later, our aim was to identify the regulatory and molecular mechanisms of dimorphism. Transcriptional profile of hyphae was investigated and the genes which showed altered mRNA levels in hyphae were identified. Comparison of these data with those of *C. albicans* (reviewed in Ernst, 2000 and Biswas et al., 2007) revealed common genes of the dimorphic pathways in the two distant relative species.

Several regulators, such as *pkal* gene was also found among the dimorphic genes. Thus, a *pkal* deleted mutant was created, whose RNA sequencing and phenotypic studies revealed the exact role of the *pka1* protein in the cells. In contrast to other pathogenic fungi and similarly to *Sch. pombe*

(Sonneborn et al, 2000; Toda et al, 1987), the absence of the *pka1* gene was not lethal. Furthermore, it regulated not only dimorphism and elongation of hyphae, but cell size, aging and stress responses as well. Its target genes were involved in the transmembrane transport, signalling, and carbohydrate metabolism.

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

VII. Köszönetnyilvánítás

Mindenek felett nagy hálát adok Istennek, hogy e munka során bölccsé tett és megtanított, hogy melyik úton járjak.

Szeretném megköszönni Gálné Dr. Miklós Ida témavezetőmnek a munkám során nyújtott professzionális szakmai segítségét és, hogy lehetővé tette a munkám és e dolgozat elkészítését.

Köszönetet szeretnék mondani Lakatos Zoltánnénak, akitől a kísérletes munkákban sok segítséget kaptam.

Köszönettel tartozok a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak, hogy segítségnyújtásukkal támogatták munkámat.

VIII. Irodalom

Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol.* 2012 May;50(4):337-45.

Alonso-Monge R, Navarro-García F, Román E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C, Pla. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2003 Apr;2(2):351-61.

Ambesi A, Miranda M, Petrov VV, Slayman CW. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H(+)-ATPase. *J Exp Biol.* 2000 Jan;203(Pt 1):155-60.

Aoki K, Nakajima R, Furuya K, Niki H. Novel episomal vectors and a highly efficient transformation procedure for the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Yeast.* 2010 Dec;27(12):1049-60.

Bahn YS, Xue C, Idnurm A, Rutherford JC, Heitman J, Cardenas ME. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Jan;5(1):57-69.

Bahn YS, Mühlshlegel FA. CO₂ sensing in fungi and beyond. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Dec;9(6):572-8.

Barlow AJ, Aldersley T, Chattaway FW. Factors present in serum and seminal plasma which promote germ-tube formation and mycelial growth of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1974;82:261–272.

Berthon AS, Szarek E, Stratakis CA. PRKACA: the catalytic subunit of protein kinase A and adrenocortical tumors. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:26.

Bertuzzi M, Schrettl M, Alcazar-Fuoli L, Cairns TC, Muñoz A, Walker LA, Herbst S, Safari M, Cheverton AM, Chen D, Liu H, Saijo S, Fedorova ND, Armstrong-James D, Munro CA, Read ND, Filler SG, Espeso EA, Nierman WC, Haas H, Bignell EM. The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog.* 2014 Oct;10(10):e1004413.

Bignell E. The Molecular Basis of pH Sensing, Signaling, and Homeostasis in Fungi. *Adv Appl Microbiol.* 2012;79:1-18.

Bignell EM. Conservation in *Aspergillus fumigatus* of pH-signaling seven transmembrane domain and arrestin proteins, and implications for drug discovery. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Dec;1273:35-43.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

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

Bouza E. The role of antifungals against candida Biofilm in catheter-related candidemia. *Antibiotics* 2015;4: 1-17.

Bölker M. *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology.* 2001 Jun;147(Pt 6):1395-401.

Braun BR, Kadosh D, Johnson AD. NRG1, a repressor of filamentous growth in *C.albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J.* 2001 Sep 3;20(17):4753-61.

Calderon J, Zavrel M, Ragni E, Fonzi WA, Rupp S, Popolo L. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion. *Microbiology.* 2010 Aug;156(Pt 8):2484-94.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001 Jul;9(7):327-35.

Cassola A, Parrot M, Silberstein S, Magee BB, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryot Cell.* 2004 Feb;3(1):190-9.

Cervantes-Chávez JA, Kronberg F, Passeron S, Ruiz-Herrera J. Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet Biol.* 2009 May;46(5):390-9.

Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 6;101(14):5048-52.

Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Van Zeebroeck G, Rubio-Teixeira M, Thevelein JM. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev. 2014 Mar;38(2):254-99.

Cooney NM, Klein BS. Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. Curr Opin Microbiol. 2008 Dec;11(6):511-6.

Crabtree JN, Okagaki LH, Wiesner DL, Strain AK, Nielsen JN, Nielsen K. Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2012 Nov;80(11):3776-85.

Cramer KL, Gerrald QD, Nichols CB, Price MS, Alspaugh JA. Transcription factor Nrg1 mediates capsule formation, stress response, and pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell. 2006 Jul;5(7):1147-56.

D'Souza CA, Alspaugh JA, Yue C, Harashima T, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Mol Cell Biol. 2001 May;21(9):3179-91.

D'Souza CA, Heitman J. Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. FEMS Microbiol Rev. 2001 May;25(3):349-64.

Davenport KD, Williams KE, Ullmann BD, Gustin MC. Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. Genetics. 1999 Nov;153(3):1091-103.

Davis D, Edwards JE Jr, Mitchell AP, Ibrahim AS. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. Infect Immun. 2000 Oct;68(10):5953-9.

Davis D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. Curr Genet. 2003 Oct;44(1):1-7.

Davis D, Wilson RB, Mitchell AP. RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* 2000 Feb;20(3):971-8.

Deveau A, Piispanen AE, Jackson AA, Hogan DA. Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot Cell.* 2010 Apr;9(4):569-77.

Dunaevsky YE, Gruban TN, Beliakova GA, Belozersky MA. Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*. *Biochemistry (Mosc).* 2000 Jun;65(6):723-7.

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

Elías-Villalobos A, Fernández-Álvarez A, Ibeas JI. The general transcriptional repressor Tup1 is required for dimorphism and virulence in a fungal plant pathogen. *PLoS Pathog.* 2011 Sep;7(9):e1002235.

Elleuche S, Pöggeler S. Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology.* 2010 Jan;156(Pt 1):23-9.

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

Fajardo-Somera RA, Bowman B, Riquelme M. The plasma membrane proton pump PMA-1 is incorporated into distal parts of the hyphae independently of the Spitzenkörper in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2013 Aug;12(8):1097-105.

Feng Q, Summers E, Guo B, Fink G. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1999 Oct;181(20):6339-46.

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

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

Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cell Signal*. 2008 Sep;20(9):1592-607.

Giacometti R, Kronberg F, Biondi RM, Passeron S. Catalytic isoforms Tpk1 and Tpk2 of *Candida albicans* PKA have non-redundant roles in stress response and glycogen storage. *Yeast*. 2009 May;26(5):273-85.

Haesendonckx S, Tudisca V, Voordeckers K, Moreno S, Thevelein JM, Portela P. The activation loop of PKA catalytic isoforms is differentially phosphorylated by Pkh protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 2012 Dec 15;448(3):307-20.

Hoffman CS. Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans*. 2005 Feb;33(Pt 1):257-60.

Hogan DA, Sundstrom P. The Ras/cAMP/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans*. *Future Microbiol*. 2009 Dec;4(10):1263-70.

Hong SH, Goh SH, Lee SJ, Hwang JA, Lee J, Choi IJ, Seo H, Park JH, Suzuki H, Yamamoto E, Kim IH, Jeong JS, Ju MH, Lee DH, Lee YS. Upregulation of adenylate cyclase 3 (ADCY3) increases the tumorigenic potential of cells by activating the CREB pathway. *Oncotarget*. 2013 Oct;4(10):1791-803.

Horák J. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Curr Genet*. 2013 May;59(1-2):1-31.

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

Hudson DA, Sciascia QL, Sanders RJ, Norris GE, Edwards PJ, Sullivan PA, Farley PC. Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. *Microbiology*. 2004 Sep;150(Pt 9):3041-9.

Innocenti A, Hall RA, Scozzafava A, Mühlischlegel FA, Supuran CT. Carbonic anhydrase activators: activation of the beta-carbonic anhydrases

from the pathogenic fungi *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with amines and amino acids. *Bioorg Med Chem*. 2010 Feb;18(3):1034-7.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990 Nov 30;96(1):23-8.

Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012 Jan;10(1):85-93

Kadosh D. Shaping up for battle: morphological control mechanisms in human fungal pathogens. *PLoS Pathog*. 2013;9(12):e1003795.

Kane PM. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006 Mar;70(1):177-91.

Kim DU, Hayles J, Kim D, Wood V, Park HO, Won M, Yoo HS, Duhig T, Nam M, Palmer G, Han S, Jeffery L, Baek ST, Lee H, Shim YS, Lee M, Kim L, Heo KS, Noh EJ, Lee AR, Jang YJ, Chung KS, et al. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*. 2010 Jun;28(6):617-23.

Kim JH, Roy A, Jouandot D 2nd, Cho KH. The glucose signaling network in yeast. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Nov;1830(11):5204-10.

Kim SK, El Bissati K, Ben Mamoun C. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 2006 Oct;152(Pt 10):2885-94.

Klein BS, Tebbets B. Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol*. 2007 Aug;10(4):314-9. Epub 2007 Aug 23.

Kozubowski L, Lee SC, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol*. 2009 Mar;11(3):370-80.

Kraus PR, Boily MJ, Giles SS, Stajich JE, Allen A, Cox GM, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryot Cell*. 2004 Oct;3(5):1249-60.

Kronstad JW, Hu G, Choi J. The cAMP/Protein Kinase A Pathway and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mycobiology*. 2011 Sep;39(3):143-50.

Leach MD, Cowen LE. Membrane fluidity and temperature sensing are coupled via circuitry comprised of Ole1, Rsp5, and Hsf1 in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2014 Aug;13(8):1077-84.

Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc*. 2010 May;7(3):186-96.

Lindsay AK, Deveau A, Piispanen AE, Hogan DA. Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2012 Oct;11(10):1219-25.

Liu Z, Thornton J, Spírek M, Butow RA. Activation of the SPS amino acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the phosphorylation state of a sensor component, Ptr3. *Mol Cell Biol*. 2008 Jan;28(2):551-63.

Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):939-49.

Lyne R, Burns G, Mata J, Penkett CJ, Rustici G, Chen D, Langford C, Vetrie D, Bähler J. Whole-genome microarrays of fission yeast: characteristics, accuracy, reproducibility, and processing of array data. *BMC Genomics*. 2003 Jul 10;4(1):27.

Maeda T. The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi. *FEBS J*. 2012 Apr;279(8):1407-13.

Maeda T, Watanabe Y, Kunitomo H, Yamamoto M. Cloning of the *pk1* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 1994 Apr 1;269(13):9632-7.

Maidan MM, Thevelein JM, Van Dijck P. Carbon source induced yeast-to-hypha transition in *Candida albicans* is dependent on the presence of amino acids and on the G-protein-coupled receptor Gpr1. *Biochem Soc Trans*. 2005 Feb;33(Pt 1):291-3.

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

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

Mayorga ME, Gold SE. A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol.* 1999 Nov;34(3):485-97.

Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G, Painter A, Sacco M, Carratu L. Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest.* 1986 Dec;78(6):1638-47.

Metzger MB, Michaelis S. Analysis of quality control substrates in distinct cellular compartments reveals a unique role for Rpn4p in tolerating misfolded membrane proteins. *Mol Biol Cell.* 2009 Feb;20(3):1006-19.

Michielse CB, van Wijk R, Reijnen L, Manders EM, Boas S, Olivain C, Alabouvette C, Rep M. The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathog.* 2009 Oct;5(10):e1000637

Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:165-99.

Mogensen EG, Janbon G, Chaloupka J, Steegborn C, Fu MS, Moyrand F, Klengel T, Pearson DS, Geeves MA, Buck J, Levin LR, Mühlischlegel FA. *Cryptococcus neoformans* senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryot Cell.* 2006 Jan;5(1):103-11.

Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, Sánchez-Pérez M, Nombela C. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol.* 1998 Jun;1(2):95-106.

Morsomme P, Boutry M. The plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2000 May 1;1465(1-2):1-16.

Murad AM, Leng P, Straffon M, Wishart J, Macaskill S, MacCallum D, Schnell N, Talibi D, Marechal D, Tekaiia F, d'Enfert C, Gaillardin C,

Odds FC, Brown AJ. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.* 2001 Sep 3;20(17):4742-52.

Nadal M, García-Pedrajas MD, Gold SE. Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Jul;284(2):127-34.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Sep;67(3):400-28.

Nantel A, Dignard D, Bachewich C, Harcus D, Marcil A, Bouin AP, Sensen CW, Hogues H, van het Hoog M, Gordon P, Rigby T, Benoit F, Tessier DC, Thomas DY, Whiteway M. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell.* 2002;13: 3452–3465

Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. Detection and measurement of two-component systems that control dimorphism and virulence in fungi. *Methods Enzymol.* 2007;422:465-87.

Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jun;72(6):3805-13.

Nicholls S, MacCallum DM, Kaffarnik FA, Selway L, Peck SC, Brown AJ. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 2011 Mar;48(3):297-305.

Nobile CJ, Solis N, Myers CL, Fay AJ, Deneault JS, Nantel A, Mitchell AP, Filler SG. *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol.* 2008 Nov;10(11):2180-96.

Noble SM, Johnson AD. Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet.* 2007;41:193-211.

Ou Y, Zheng X, Gao Y, Shu M, Leng T, Li Y, Yin W, Zhu W, Huang Y, Zhou Y, Tang J, Qiu P, Yan G, Hu J, Ruan H, Hu H. Activation of cyclic

AMP/PKA pathway inhibits bladder cancer cell invasion by targeting MAP4-dependent microtubule dynamics. *Urol Oncol*. 2014 Jan;32(1):47.e21-8.

Palmer GE. Vacuolar trafficking and *Candida albicans* pathogenesis. *Commun Integr Biol*. 2011 Mar;4(2):240-2.

Pan X, Heitman J. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999 Jul;19(7):4874-87.

Park SH, Koh SS, Chun JH, Hwang HJ, Kang HS. Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):2044-50.

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

Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Nov;68(11):5459-63.

Roberts RL, Fink GR. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev*. 1994 Dec 15;8(24):2974-85.

Robertson LS, Fink GR. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13783-7.

Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*. 2002 May;2(2):183-201.

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

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

Sabina J, Brown V. Glucose sensing network in *Candida albicans*: a sweet spot for fungal morphogenesis. *Eukaryot Cell*. 2009 Sep;8(9):1314-20.

Sambrook J, Russel WD. Agarose Gel Electrophoresis. CSH Protocols. 2006

Sánchez-Martínez C, Pérez-Martín J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*--similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Apr;4(2):214-21.

Schumacher J, Kokkelink L, Huesmann C, Jimenez-Teja D, Collado IG, Barakat R, Tudzynski P, Tudzynski B. The cAMP-dependent signaling pathway and its role in conidial germination, growth, and virulence of the gray mold *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2008 Nov;21(11):1443-59.

Selvig K, Alspaugh JA. pH Response Pathways in Fungi: Adapting to Host-derived and Environmental Signals. *Mycobiology.* 2011 Dec;39(4):249-56.

Sengupta N, Vinod PK, Venkatesh KV. Crosstalk between cAMP-PKA and MAP kinase pathways is a key regulatory design necessary to regulate FLO11 expression. *Biophys Chem.* 2007 Jan;125(1):59-71.

Shapiro RS, Cowen LE. Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing. *MBio.* 2012 Oct 2;3(5).

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

Sipiczki M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S, Miklos I. Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology.* 1998 May;144 (Pt5):1319-30.

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

Smith DA, Morgan BA, Quinn J. Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways. *FEMS Microbiol Lett.* 2010 May;306(1):1-8.

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

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

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

Spencer JF, Ragout de Spencer AL, Laluce C. Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002 Feb;58(2):147-56.

Steen BR, Lian T, Zuyderduyn S, MacDonald WK, Marra M, Jones SJ, Kronstad JW. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res*. 2002 Sep;12(9):1386-400.

Tamaki H. Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*. 2007 Oct;104(4):245-50.

Thevelein JM, de Winde JH. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 1999 Sep;33(5):904-18.

Thevelein JM, Geladé R, Holsbeeks I, Lagatie O, Popova Y, Rolland F, Stolz F, Van de Velde S, Van Dijck P, Vandormael P, Van Nuland A, Van Roey K, Van Zeebroeck G, Yan B. Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem Soc Trans*. 2005 Feb;33(Pt 1):253-6.

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

Tortora G, Ciardiello F. Protein kinase A as target for novel integrated strategies of cancer therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun;968:139-47.

Valerius O, Draht O, Kübler E, Adler K, Hoffmann B, Braus GH. Regulation of hisHF transcription of *Aspergillus nidulans* by adenine and amino acid limitation. *Fungal Genet Biol*. 2001 Feb;32(1):21-31.

Van Dijck P. Nutrient sensing G protein-coupled receptors: interesting targets for antifungals? *Med Mycol*. 2009 Nov;47(7):671-80.

Vyas VK, Berkey CD, Miyao T, Carlson M. Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell. 2005 Nov;4(11):1882-91.

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

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

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

Wixon J. Featured organism: *Schizosaccharomyces pombe*, the fission yeast. Comp Funct Genomics. 2002;3(2):194-204.

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature. 2002 Feb 21;415(6874):871-80.

Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Research. 1989/05/11 00:00; 17(9): 3469-3478

Xu D, Sillaots S, Davison J, Hu W, Jiang B, Kauffman S, Martel N, Ocampo P, Oh C, Trosok S, Veillette K, Wang H, Yang M, Zhang L, Becker J, Martin CE, Roemer T. Chemical genetic profiling and characterization of small-molecule compounds that affect the biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Candida albicans*. J Biol Chem. 2009 Jul 17;284(29):19754-64.

Yu B, Ragazzon B, Rizk-Rabin M, Bertherat J. Protein kinase Alterations in endocrine tumors. Horm Metab Res. 2012 Sep;44(10):741-8.

Könyvek:

Dunlap JC. Fungal Genomics: Advances in Genetics: 57, 2011, ISBN-10: 0120176572

Baron S. Medical Microbiology, 4th edition, 1996, ISBN-10: 0-9631172-1-1

Freeman W.H. Molecular Cell Biology 4th edition, 2000, ISBN-10: 0-7167-3136-32000

Freeman W.H. Molecular Cell Biology 5th edition, 2003, ISBN-10: 0716743663

Isaac S. What is meant by the term dimorphism as applied to fungi and is it an important phenomenon? Mycologist, 1996 (10)3:134-135

Mehrabi R. The cAMP signaling and MAP kinase pathways in plant pathogenic fungi. The Mycota 5, 2009:157-172

Ruiz-Herrera J. Dimorphic fungi: Their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis. 2012, ISBN-978-1-60805-510-4

Rutherford J. Direct sensing of nutrient availability by fungi. Fungal Biology Reviews 2011;25: 111-119

Pérez Martín, J. Morphogenesis and pathogenicity in fungi. Topics in Current Genetics 2012, ISBN 978-3-642-22916-9

Walker GM. Yeast Physiology and Biotechnology, 1998, ISBN: 978-0-471-96446-9

Online hivatkozás

- 1 [http://www.carpathianbasinspecies.eu/1_Mushrooms \(Fungi\)/Virok_V._Mus room_1/Ustilago%20maydis_1_1_logo.jpg](http://www.carpathianbasinspecies.eu/1_Mushrooms_(Fungi)/Virok_V._Mus_room_1/Ustilago%20maydis_1_1_logo.jpg)
- 2 [http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening %20Help/images/Pests/Fusarium_Wilt_of_Tomato182.jpg](http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening%20Help/images/Pests/Fusarium_Wilt_of_Tomato182.jpg)
- 3 <https://www.sheffield.ac.uk/mbb/staff/sudbery>
- 4 http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dimorphic_Pathogens/Histoplasma/
- 5 http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_kinase_A
- 6 <http://www.pombase.org/>
- 7 <http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/index.html>
- 8 http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/
- 9 <https://beta-static.fishersci.com/images/F100437~w1.jpg>
- 10 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>

Papp László Attila Publikációs lista

A dolgozat témájához kapcsolódó referált, nemzetközi folyóiratban megjelent cikk:

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

Egyéb:

Előadások:

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

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

Poszterek:

1. Laszlo PAPP, Ida MIKLOS, Matthias SIPICZKI. Effect of environmental conditions on the *Sch.japonicus* dimorphism, MMT, Budapest, 2012
2. L.A Papp, Ida Miklós, M. Sipiczki. Dimorphism in *Schizosaccharomyces japonicus*, MMT, Keszthely, 2012

3. Papp L.A., Miklos I., Sipiczki M. Environmental sensing through protein kinase A in *Schizosaccharomyces japonicus*, 30th ISSY, Slovakia, 2013
4. László Attila Papp, Matthias Sipiczki, Ida Miklós. Protein kinase A signaling in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*, Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2015
5. Lajos Ács-Szabó, László Attila Papp, Matthias Sipiczki, Ida Miklós. Conserved synteny and gene order determination in *Schizosaccharomyces*, Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2015

IX. Függelék

Függelék 1. táblázat: a 7-1 törzs hifás állaoptú sejtjeinek RNS szekvenálási adatsora.

gene	locus	value_1	value_2	log2(fold_change)
SJAG_04620 SUR7 family protein-cell wall	Supercontig_5.3:48	1,34213	132,085	6,6208
SJAG_02124 cobW	Supercontig_5.1:42	1,12525	87,0783	6,274
SJAG_04836 hypothetical protein 8 példány Sj-ban 2-1 octo/cry + nincs pom	Supercontig_5.3:36	0,210294	12,7581	5,92286
SJAG_06639 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.5:39	0,242417	11,5173	5,57017
SJAG_02943 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:86	0,284394	10,8436	5,25282
SJAG_00240 alcohol dehydrogenase Adh4	Supercontig_5.1:37	2,05046	78,1664	5,25253
SJAG_00179 glutathione S-transferase Gst2	Supercontig_5.1:38	61,0483	2284,01	5,22548
SJAG_00922 OPT oligopeptide transporter Isp4	Supercontig_5.1:23	0,766471	18,9133	4,62502
SJAG_01093 hypothetical protein 8 példány Sj-ban 2-1 octo/cry + nincs pom	Supercontig_5.1:27	0,781951	18,8525	4,59153
SJAG_00161 hypothetical protein 3 példány S.pombe-ban és csak 1 Sj-ben	Supercontig_5.1:39	8,5949	185,241	4,42978
SJAG_06588 hypothetical protein	Supercontig_5.1:25	0,122303	2,36716	4,27463
SJAG_06598 hypothetical protein 2 példány Sj-ban többiben 1-1	Supercontig_5.2:53	0,048232	0,91083	4,23912
SJAG_01986 alcohol dehydrogenase	Supercontig_5.3:27	52,0618	928,611	4,15678
SJAG_00124 transcriptional regulator NRG1	Supercontig_5.1:4	1,65347	27,42	4,05163
SJAG_04365 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:25	3,79671	60,9574	4,00498
SJAG_02788 fungal protein	Supercontig_5.1:14	1,54379	22,0862	3,8386
SJAG_04808 hypothetical protein 8 példány Sj-ban 2-1 octo/cryo és nincs px	Supercontig_5.3:93	2,29391	31,0942	3,76076
SJAG_02192 glucan 1,3-beta-glucosidase Bgl2	Supercontig_5.1:20	44,7915	592,145	3,72465
SJAG_05250 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:26	2,00037	25,7222	3,68467
SJAG_02896 hydroxymethylbilane synthase	Supercontig_5.1:16	3,7764	48,3584	3,67868
SJAG_00018 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:42	0,787333	9,80367	3,63828
SJAG_03283 poly(A) binding protein Crp79	Supercontig_5.2:78	5,19426	62,2076	3,5821
SJAG_06641 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.18:4	0,701051	8,15079	3,53935
SJAG_04807 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:95	0,161994	1,85733	3,51922
SJAG_04590 sequence orphan//hypothetical protein	Supercontig_5.3:55	43,7437	497,377	3,50719
SJAG_05920 hypothetical protein 1-1-1 Sj/Scryo/Socto + nincs pombe-ban	Supercontig_5.1:67	2,41048	25,6087	3,40924
SJAG_06591 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:25	0,462978	4,9073	3,40591
SJAG_01091 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:30	0,431899	4,41664	3,35418
SJAG_00703 DUF1674//hypothetical protein	Supercontig_5.1:28	17,1817	166,72	3,27848
SJAG_00025 hypothetical protein 8 példány Sj-ban 2-1 octo/cryo és nincs px	Supercontig_5.1:42	4,23882	39,9843	3,2377
SJAG_04352 cyclophilin family peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Wis2	Supercontig_5.2:25	153,316	1442,4	3,23389
SJAG_04575 meiotic chromosome segregation protein Meu6	Supercontig_5.3:58	5,77845	53,9157	3,22195
SJAG_01690 NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase ydfG	Supercontig_5.3:21	75,5583	702,999	3,21786
SJAG_05015 NADPH dehydrogenase	Supercontig_5.2:20	25,7366	239,405	3,21756
SJAG_01096 amino acid permease	Supercontig_5.1:21	1,63212	15,0782	3,20765
SJAG_00100 meiosis specific cyclin Crs1	Supercontig_5.1:40	0,652209	5,89797	3,17681
SJAG_02127 trichothecene 3-O-acetyltransferase	Supercontig_5.1:32	0,24939	2,24064	3,16743
SJAG_02967 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:16	1,80574	15,9852	3,14607
SJAG_04586 F-box protein Pof8	Supercontig_5.3:56	0,741198	6,55334	3,1443
SJAG_02458 transcription factor TFIID complex subunit A/SAGA complex subu	Supercontig_5.1:77	3,28359	28,7066	3,12804
SJAG_00497 ribosomal protein subunit L34	Supercontig_5.1:32	7,74831	66,6521	3,1047
SJAG_04696 kinetochore protein Mis15	Supercontig_5.3:32	21,7939	173,395	2,99207

SJAG_03607 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:14	0,160545	1,2713	2,98526
SJAG_04842 pyruvate decarboxylase	Supercontig_5.2:23	793,963	6285,86	2,98497
SJAG_02569 transcription factor	Supercontig_5.1:99	11,699	90,864	2,95732
SJAG_00110 But2 family protein Schizosaccharomyces specifikus!!!	Supercontig_5.1:40	4,85139	37,6236	2,95517
SJAG_04468,SJAG_04469,SJAG_04470 STE/STE11/CDC15 protein kinase Cdc7; HAL protein kinase Ppk24; septin Spn7	Supercontig_5.3:80	24,3614	181,765	2,89941
SJAG_01975 kinetochore protein fta5	Supercontig_5.3:27	19,2601	142,939	2,89172
SJAG_05118 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.18:1	0,168106	1,23871	2,8814
SJAG_00586 inositol metabolism protein Opi10	Supercontig_5.1:30	25,3959	186,889	2,87951
SJAG_05533 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:23	2,10119	15,262	2,86067
SJAG_02940 trichothecene 3-O-acetyltransferase	Supercontig_5.2:78	4,68754	33,4948	2,83703
SJAG_03078 hypothetical protein	Supercontig_5.2:38	26,2828	180,837	2,7825
SJAG_02928 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:17	2,65124	18,1782	2,77747
SJAG_01095 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:21	3,01066	20,2016	2,74632
SJAG_00413 acetyl-CoA C-acetyltransferase Erg10	Supercontig_5.1:33	115,625	760,475	2,71745
SJAG_04774 hypothetical protein csak S.japonicus/S.pombe	Supercontig_5.3:15	0,681596	4,38397	2,68525
SJAG_04554 wiskott-Aldrich syndrome binding protein Lsb1	Supercontig_5.3:63	7,71143	49,4709	2,68151
SJAG_01552 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:18	0,827828	5,22798	2,65885
SJAG_01828 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:24	21,3735	134,438	2,65305
SJAG_01028 cell wall alpha-1,3-glucan synthase mok11	Supercontig_5.1:21	14,2561	89,1101	2,64401
SJAG_00021 trichothecene 3-O-acetyltransferase	Supercontig_5.1:42	0,363405	2,26691	2,64108
SJAG_02107 enolase//hypothetical protein 3 példány Sj-ban, 1-1-1 S.pombe	Supercontig_5.3:30	100,982	606,231	2,58578
SJAG_02827 ER oxidoreductin Ero1a	Supercontig_5.1:15	115,043	685,704	2,57541
SJAG_02233 G-protein alpha subunit	Supercontig_5.1:29	72,4352	422,518	2,54425
SJAG_02313 D-3 phosphoglycerate dehydrogenase	Supercontig_5.1:46	130,633	751,39	2,52405
SJAG_04835 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:36	0,489561	2,74352	2,48647
SJAG_02825 hsp78-like protein	Supercontig_5.1:15	70,5992	393,06	2,47702
SJAG_03991,SJAG_03992 seq.orphan; sulfhydryl oxidase	Supercontig_5.2:33	4,49878	24,9652	2,47231
SJAG_00259 gar2 hypothetical protein	Supercontig_5.1:37	162,571	901,255	2,47087
SJAG_06620 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:11	8,90182	48,595	2,44863
SJAG_02459 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:77	12,8721	69,8884	2,44081
SJAG_01553 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:18	3,07123	16,5416	2,42921
SJAG_00262,SJAG_00264	Supercontig_5.1:37	83,6161	447,182	2,41901
SJAG_00305 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase Htd2	Supercontig_5.1:36	13,1374	70,1069	2,41587
SJAG_02734 pyruvate decarboxylase	Supercontig_5.1:13	42,9022	227,364	2,40588
SJAG_03794 DNAJ domain-containing protein Psi1	Supercontig_5.2:37	62,8011	331,931	2,40202
SJAG_03976 transcription like zf-ZZ type zinc finger protein	Supercontig_5.2:33	14,128	71,2615	2,33456
SJAG_04621 alpha-actinin	Supercontig_5.3:48	26,6304	129,846	2,28565
SJAG_02532 MS ion channel protein 1	Supercontig_5.1:92	15,03	72,9223	2,27852
SJAG_04185 ZIP zinc transporter Zrt1	Supercontig_5.2:29	380,099	1821,97	2,26105
SJAG_02132 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:58	0,884706	4,23934	2,26057
SJAG_01477 fungal protein	Supercontig_5.3:17	42,1373	200,821	2,25274

SJAG_00410 LYHRT protein//hypothetical protein	Supercontig_5.1:34	12,4546	58,5436	2,23283
SJAG_00027 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	Supercontig_5.1:41	212,005	992,684	2,22724
SJAG_03390 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:10	10,7463	49,8876	2,21484
SJAG_03026 checkpoint clamp complex protein Hus1	Supercontig_5.2:28	9,33482	43,1582	2,20894
SJAG_01768 ubiquitin-specific protease	Supercontig_5.3:23	21,1782	97,2966	2,19981
SJAG_00019 amino acid permease	Supercontig_5.1:42	1,20862	5,51662	2,19042
SJAG_02113 amino acid permease	Supercontig_5.2:28	13,212	60,0681	2,18476
SJAG_02944 hypothetical protein 8 példány S.japonicusban 2-1 octo/cryo és	Supercontig_5.2:91	2,67304	12,0684	2,17468
SJAG_04303 meiotic recombination protein Rec25	Supercontig_5.2:26	64,707	287,698	2,15256
SJAG_02191 GFO/IDH/MocA family oxidoreductase	Supercontig_5.1:20	36,4616	161,814	2,14988
SJAG_02710 hypothetical protein nincs S.pombe-ban	Supercontig_5.1:13	8,48298	37,5783	2,14726
SJAG_01450 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:16	33,8562	149,941	2,1469
SJAG_02581 hypothetical protein 2 példány Sj-ban 1-1-1 S.pombe/S.cryo/S.	Supercontig_5.1:10	15,4722	68,4428	2,14522
SJAG_03204 phospholipase	Supercontig_5.2:62	17,9612	79,1993	2,1406
SJAG_04268 HAL protein kinase Oca2	Supercontig_5.2:27	30,6633	134,606	2,13415
SJAG_03364 60S ribosomal protein L39	Supercontig_5.2:95	18647,3	81437,9	2,12673
SJAG_04555 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:63	2,07371	9,05093	2,12585
SJAG_01475 SAGA complex/transcription initiation factor Taf9	Supercontig_5.3:17	18,5542	80,6286	2,11955
SJAG_03809 Cdc20/Fizzy family WD repeat protein	Supercontig_5.2:37	6,51237	28,2422	2,1166
SJAG_01742,SJAG_05740 TENA/THI domain-containing protein; sequence orphan hypothetical protein	ntig_5.3:2268120-2	13,4067	58,0025	2,11316
SJAG_03747 poly(A) binding protein Nab3	Supercontig_5.2:17	66,3562	281,555	2,08511
SJAG_01261 leucine carboxyl methyltransferase	Supercontig_5.3:12	3,94661	16,6929	2,08055
SJAG_01725 transcription factor Atf21	Supercontig_5.3:22	182,873	761,29	2,0576
SJAG_04008 cytochrome c heme lyase	Supercontig_5.2:33	11,0987	46,0151	2,05172
SJAG_01132 40S ribosomal protein S13	Supercontig_5.3:10	2025,88	8373,63	2,0473
SJAG_00641 SAGA complex subunit Sus1	Supercontig_5.1:29	23,4864	96,1274	2,03313
SJAG_03671 cystathionine beta-lyase	Supercontig_5.2:15	9,07941	36,9133	2,02347
SJAG_02478 beta-glucosidase Adg3	Supercontig_5.1:81	36,7821	149,215	2,02032
SJAG_01829 ribosomal protein subunit L2	Supercontig_5.3:24	26,6992	108,19	2,0187
SJAG_01421 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.3:15	3,78823	15,2778	2,01184
SJAG_00452 ubiquitin	Supercontig_5.1:33	1113,92	4474,01	2,00593
SJAG_02017 translation elongation factor EF-1 gamma subunit	Supercontig_5.3:28	565,985	2267,11	2,00202
SJAG_02941 aminoacid permease	Supercontig_5.2:82	0,405318	1,62242	2,00103
SJAG_01051 CUE domain-containing protein Cue1/4 family protein	Supercontig_5.1:20	34,2419	136,232	1,99223
SJAG_01846 But2 family protein But2	Supercontig_5.3:24	223,447	888,238	1,99101
SJAG_02586 SNARE Slt1	Supercontig_5.1:10	36,4169	141,409	1,9572
SJAG_00714 aspartate aminotransferase	Supercontig_5.1:28	5,07151	19,5798	1,94888
SJAG_03800 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:37	2,24032	8,61327	1,94286
SJAG_03778 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:38	1,51239	5,78516	1,93553
SJAG_01836 CAF1 family ribonuclease	Supercontig_5.3:24	9,6883	36,8926	1,92902
SJAG_04694,SJAG_04695: WD repeat protein Prp5; ribosomal protein	Supercontig_5.3:32	1234,21	4699,7	1,92898
SJAG_04028 calcium permease	Supercontig_5.2:32	12,7052	48,3406	1,92782

SJAG_03142 guanyl-nucleotide exchange factor	Supercontig_5.2:50	51,4225	195,392	1,9259
SJAG_02812 translation elongation factor eIF5A	Supercontig_5.1:15	283,83	1078,19	1,92551
SJAG_00802 nutritional copper sensing transcription factor Cuf1	Supercontig_5.1:26	14,7653	56,0467	1,92442
SJAG_01755 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.3:22	184,129	697,191	1,92084
SJAG_05322 RNA-binding protein	Supercontig_5.2:30	21,9887	82,5299	1,90816
SJAG_03653 thioredoxin reductase Trr1	Supercontig_5.2:15	155,517	582,478	1,90513
SJAG_01186 heat shock protein S	Supercontig_5.3:11	424,467	1584,24	1,90007
SJAG_03203 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:62	23,8813	88,6506	1,89225
SJAG_03123 cell wall biosynthesis/cell cycle regulator	Supercontig_5.2:46	20,8517	77,038	1,88541
SJAG_00495,SJAG_00496: ornithine aminotransferase; atypical/ABC1/ABC1-C	Supercontig_5.1:32	136,622	504,753	1,88538
SJAG_05573 hypothetical protein	Supercontig_5.3:10	30,3096	111,932	1,88477
SJAG_03141 homoserine kinase	Supercontig_5.2:50	5,16537	19,0662	1,88408
SJAG_04681 IMPcyclohydrolase/phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideform	Supercontig_5.3:36	84,1764	309,977	1,88067
SJAG_06534 fungal protein	Supercontig_5.2:21	3,03895	11,1881	1,88032
SJAG_01027 transporter Sft2//hypothetical protein	Supercontig_5.1:21	13,3065	48,9245	1,87843
SJAG_01669 P-type proton ATPase Pma1	Supercontig_5.3:21	115,138	416,341	1,85439
SJAG_05258 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:23	19,6349	70,9011	1,85239
SJAG_02159 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:12	10,2305	36,795	1,84663
SJAG_00972 NADPH-dependent diflavin oxidoreductase	Supercontig_5.1:22	27,2858	97,8192	1,84197
SJAG_01416 pig-L	Supercontig_5.3:15	13,5198	48,4599	1,84171
SJAG_04660 xylose and arabinose reductase	Supercontig_5.3:40	27,9547	99,3833	1,82991
SJAG_04225 plasma membrane protein	Supercontig_5.2:28	6,86634	24,3734	1,82769
SJAG_03608 hexose transporter Ght5	Supercontig_5.2:14	94,7486	332,663	1,81189
SJAG_03815 hsp16-like protein//hypothetical protein 14 db a S.cryo-ban 6db	Supercontig_5.2:37	3667,35	12842,1	1,80807
SJAG_03784 hypothetical protein	Supercontig_5.2:38	987,569	3453,71	1,80619
SJAG_03074 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.2:38	13,1495	45,4284	1,78859
SJAG_04557 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:62	8,1145	27,9066	1,78203
SJAG_00785 Sed5 Vesicle protein Svp26	Supercontig_5.1:26	68,2694	234,299	1,77904
SJAG_00354 hypothetical protein	Supercontig_5.1:35	6,9314	23,6539	1,77086
SJAG_01970 thiamine-repressible acid phosphatase pho4	Supercontig_5.3:27	52,1702	177,046	1,76282
SJAG_03565 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:13	32,1207	108,695	1,75871
SJAG_01766 glycine hydroxymethyltransferase ami a serine hydroxymethyltransferase Shm2 család	Supercontig_5.3:2317746-2	292,028	987,49	1,75766
SJAG_01691 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.3:21	17,6694	59,6134	1,75439
SJAG_00582,SJAG_00583,SJAG_00584	Supercontig_5.1:30	66,6363	224,801	1,75427
SJAG_00717 C-5 sterol desaturase Erg31	Supercontig_5.1:27	44,5203	149,121	1,74395
SJAG_02290 homocysteine methyltransferase	Supercontig_5.1:42	173,131	578,388	1,74017
SJAG_00340 cell wall protein Ecm33	Supercontig_5.1:35	486,203	1605,26	1,72317
SJAG_04833 hypothetical protein 8 példány S.japonicusban 2-1 octo/cryo és	Supercontig_5.3:43	6,675	21,9934	1,72023
SJAG_02018 RNA-binding protein	Supercontig_5.3:28	79,2393	260,941	1,71944
SJAG_03170 MSP domain-containing protein	Supercontig_5.2:57	62,0936	204,43	1,71909
SJAG_03058 actin	Supercontig_5.2:34	439,727	1446,16	1,71754
SJAG_01247,SJAG_01248	Supercontig_5.3:12	65,5492	214,754	1,71203

SJAG_02847 hemolysin-III family protein	Supercontig_5.1:15	108,526	353,635	1,70423
SJAG_03243 3-isopropylmalate dehydratase Leu2	Supercontig_5.2:70	34,9977	113,799	1,70115
SJAG_04662 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.3:40	40,6753	132,209	1,7006
SJAG_01769 septin Spn5	Supercontig_5.3:23	11,1401	36,0863	1,69569
SJAG_04187 hsp104-like protein	Supercontig_5.2:29	533,391	1714,56	1,68457
SJAG_01007 nramp family manganese ion transporter	Supercontig_5.1:21	17,622	56,3795	1,6778
SJAG_03244 bcap family protein	Supercontig_5.2:70	180,18	573,628	1,67068
SJAG_03600 rho guanine nucleotide exchange factor	Supercontig_5.2:14	10,4125	32,653	1,6489
SJAG_04568 decaprenyl diphosphate synthase subunit Dps1	Supercontig_5.3:61	24,2221	74,7448	1,62565
SJAG_04567 hsp16-like protein	Supercontig_5.3:61	5730,09	17679,1	1,62542
SJAG_02968 iron/zinc ion transporter	Supercontig_5.2:16	8,66273	26,6071	1,61892
SJAG_01732 WASp	Supercontig_5.3:22	4,54761	13,8745	1,60925
SJAG_02062 hypothetical protein	Supercontig_5.3:29	41,0163	125,062	1,60838
SJAG_03178 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.2:58	244,339	739,528	1,59772
SJAG_01770 DUF1212 family protein	Supercontig_5.3:23	6,0064	18,0171	1,58479
SJAG_00439 cyclin-dependent protein kinase regulatory subunit Suc1	Supercontig_5.1:33	111,569	333,24	1,57862
SJAG_03777 transmembrane transporter	Supercontig_5.2:38	46,7667	139,427	1,57596
SJAG_02831 paxillin-like protein Pxl1	Supercontig_5.1:15	20,285	60,375	1,57354
SJAG_04866 no message in thiamine Nmt1, hypothetical protein	Supercontig_5.2:23	2,09137	6,21584	1,5715
SJAG_01155 fungal protein	Supercontig_5.3:10	2,93109	8,65444	1,562
SJAG_02450,SJAG_02451	Supercontig_5.1:76	160,746	501,051	1,56158
SJAG_00321 phosphoinositide phospholipase C Plc1	Supercontig_5.1:35	9,99781	29,3066	1,55154
SJAG_04813 fork head transcription factor Fkh2	Supercontig_5.3:80	14,8602	43,5467	1,55111
SJAG_02344 spermine family transporter	Supercontig_5.1:53	24,4991	71,717	1,54958
SJAG_00160 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.1:39	28,5616	83,4547	1,54692
SJAG_04898 RNA-binding protein Cwf2	Supercontig_5.2:22	23,5924	68,5452	1,53873
SJAG_01033 inorganic phosphate transporter	Supercontig_5.1:21	80,4567	233,713	1,53845
SJAG_04177 kinetochore protein Sim4	Supercontig_5.2:29	79,4256	230,65	1,53803
SJAG_03977 ADP-ribose diphosphatase	Supercontig_5.2:33	7,68197	22,279	1,53613
SJAG_02546 60S ribosomal protein L27/L28	Supercontig_5.1:95	1421,84	4114,14	1,53283
SJAG_01718 STE/STE11 protein kinase Byr2	Supercontig_5.3:22	30,4941	88,1839	1,53199
SJAG_04324 40S ribosomal protein S4	Supercontig_5.2:26	929,897	2682,5	1,52844
SJAG_06596 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.1:37	13,922	39,8272	1,51638
SJAG_00861 transcriptional corepressor Ssn6	Supercontig_5.1:25	17,0566	48,649	1,51208
SJAG_01207 transcription factor TFIIF complex subunit Tfb5	Supercontig_5.3:11	63,8281	181,99	1,5116
SJAG_04591 oxidoreductase	Supercontig_5.3:55	30,9345	88,0982	1,50989
SJAG_04086 transcriptional regulatory protein Spp41	Supercontig_5.2:31	2,42793	6,90638	1,5082
SJAG_01870,SJAG_01880,SJAG_01881,SJAG_01882	Supercontig_5.3:25	237,742	675,92	1,50745
SJAG_01121,SJAG_01122	Supercontig_5.3:10	492,616	1399,67	1,50655
SJAG_02784 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.1:14	40,6123	115,206	1,50423
SJAG_02000 tyrosine phosphatase Pyp2	Supercontig_5.3:27	7,80859	22,1455	1,50388
SJAG_01089 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Supercontig_5.1:20	319,254	904,657	1,50267
SJAG_00436 DNAJ domain-containing protein Mas5	Supercontig_5.1:33	291,986	826,16	1,50052

SJAG_02114 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:30	2,85662	8,04891	1,49448
SJAG_01850 NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase ydfG	Supercontig_5.3:24	56,8303	160,072	1,49398
SJAG_00564 hsp60-like protein	Supercontig_5.1:31	364,377	1022,15	1,4881
SJAG_04913 sphingosine hydroxylase	Supercontig_5.2:22	154,233	431,109	1,48294
SJAG_00890 mannose-1-phosphate guanyltransferase	Supercontig_5.1:24	106,03	294,768	1,47511
SJAG_03871 alpha-1,2-galactosyltransferase gmh3	Supercontig_5.2:35	2,70918	7,52562	1,47395
SJAG_04549 asparagine synthetase	Supercontig_5.3:64	41,2073	114,254	1,47128
SJAG_04475 40S ribosomal protein S2	Supercontig_5.3:79	757,202	2095,27	1,46838
SJAG_01476 RNA 3'-terminal phosphate cyclase	Supercontig_5.3:17	70,6351	195,398	1,46796
SJAG_03438 CAMK/RAD53 protein kinase Mek1	Supercontig_5.2:10	4,14796	11,4565	1,4657
SJAG_01230 Sds3-like family protein Dep1	Supercontig_5.3:12	23,9613	66,168	1,46543
SJAG_00176 Svf1 family protein Svf2	Supercontig_5.1:38	9,71407	26,7825	1,46314
SJAG_02828 DNA repair endonuclease Swi10	Supercontig_5.1:15	20,0599	55,3042	1,46307
SJAG_00269 transcriptional coactivator	Supercontig_5.1:36	316,37	871,51	1,4619
SJAG_03918 transcription factor	Supercontig_5.2:34	5,86007	16,1412	1,46176
SJAG_01901 zds family protein phosphatase type A regulator Zds1	Supercontig_5.3:25	16,7908	46,2253	1,46102
SJAG_03652 high-affinity import carrier for pyridoxine	Supercontig_5.2:15	0,941539	2,58683	1,45809
SJAG_00386 transcription factor	Supercontig_5.1:34	42,4594	116,578	1,45715
SJAG_02665 Vac7 (vacuolar)	Supercontig_5.1:12	32,716	89,5481	1,45266
SJAG_04327 glycosyl hydrolase family 16	Supercontig_5.2:26	36,815	100,446	1,44805
SJAG_04525,SJAG_04527: hypothetical; double strand specific ribonuclease	Supercontig_5.3:68	120,185	327,732	1,44727
SJAG_03063 dienelactone hydrolase	Supercontig_5.2:35	245,986	668,356	1,44204
SJAG_01061 saccharopine dehydrogenase	Supercontig_5.1:20	103,833	281,584	1,4393
SJAG_05286 rhomboid family protease	Supercontig_5.2:22	39,2927	106,143	1,43367
SJAG_02195 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:20	2,50432	6,75323	1,43116
SJAG_01721 60S ribosomal protein L17	Supercontig_5.3:22	664,379	1789,5	1,42948
SJAG_04659 fungal protein	Supercontig_5.3:40	18,5755	49,785	1,42231
SJAG_01414 alcohol dehydrogenase Adh1	Supercontig_5.3:15	286,67	767,382	1,42055
SJAG_02573 RNA-binding protein Csx1	Supercontig_5.1:10	14,451	38,515	1,41425
SJAG_01114 rho-type GTPase activating protein Rga7	Supercontig_5.3:99	50,9801	135,797	1,41344
SJAG_00465 60S ribosomal protein L11	Supercontig_5.1:32	1641,09	4360,35	1,40979
SJAG_00759 RNA-binding protein Mcp2	Supercontig_5.1:27	11,5084	30,5626	1,40908
SJAG_03256 vacuolar amino acid efflux transporter Avt8	Supercontig_5.2:73	7,11469	18,872	1,40738
SJAG_00919 trafficking protein Pga2	Supercontig_5.1:23	191,74	506,818	1,40231
SJAG_00416 vacuolar sorting protein Vps20	Supercontig_5.1:33	60,77	159,788	1,39472
SJAG_01392 F-box protein Pof5	Supercontig_5.3:15	11,3973	29,8863	1,3908
SJAG_01298 IMP dehydrogenase Gua1	Supercontig_5.3:13	778,95	2033,77	1,38456
SJAG_04664 protein disulfide isomerase	Supercontig_5.3:39	19,2941	50,3144	1,38281
SJAG_02134 hypothetical protein 8 példány S.japonicusban 2-1 octo/cryo és	Supercontig_5.1:67	9,17133	23,7626	1,37349
SJAG_03388 transcription factor Hsr1	Supercontig_5.2:10	28,8059	74,6333	1,37345
SJAG_02957 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:13	4,92649	12,7033	1,36657
SJAG_03057 alpha-1,3-glucan synthase Mok12	Supercontig_5.2:33	7,16766	18,4758	1,36607
SJAG_00414 GTPase Cwf10	Supercontig_5.1:33	25,8679	66,6602	1,36566

SJAG_00646 monopolin-like complex subunit Mde4	Supercontig_5.1:29	17,9654	46,221	1,36333
SJAG_01057 dihydroceramide delta-4 desaturase	Supercontig_5.1:20	81,8524	209,185	1,35368
SJAG_04494 30S ribosomal protein S12	Supercontig_5.3:76	21,0385	53,7304	1,3527
SJAG_02903,SJAG_02904,SJAG_02905	Supercontig_5.1:17	925,997	2357,7	1,3483
SJAG_04330 rRNA processing protein Rrp15	Supercontig_5.2:26	125,487	319,136	1,34664
SJAG_03295 cell wall protein Psu1	Supercontig_5.2:80	157,197	398,197	1,34091
SJAG_00246 acetyltransferase	Supercontig_5.1:37	5,25416	13,2781	1,33751
SJAG_02189 translation elongation factor eIF5A	Supercontig_5.1:19	400,444	1004,41	1,32667
SJAG_02649 beta-glucosidase Psu2	Supercontig_5.1:11	96,6011	241,826	1,32386
SJAG_00642 2-oxoglutarate and Fe(II) dioxygenase domain-containing	Supercontig_5.1:29	39,4964	98,8051	1,32286
SJAG_04423 hypothetical protein	Supercontig_5.2:24	5,9167	14,7897	1,32173
SJAG_00396 acetohydroxyacid reductoisomerase	Supercontig_5.1:34	707,847	1765,57	1,31862
SJAG_01519 phospholipase D	Supercontig_5.3:18	17,6874	44,0388	1,31605
SJAG_00523 40S ribosomal protein S5	Supercontig_5.1:31	1161,93	2892,4	1,31575
SJAG_01757 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:23	5,94108	14,7643	1,31332
SJAG_02745 DUF1715 family protein	Supercontig_5.1:13	96,3026	238,935	1,31097
SJAG_00070 ribose 5-phosphate isomerase	Supercontig_5.1:41	12,8762	31,8938	1,30856
SJAG_04584 transcription factor zf-C2H2 type	Supercontig_5.3:56	36,9252	91,2667	1,30548
SJAG_01925 exocyst complex subunit Sec6	Supercontig_5.3:26	9,30697	22,9909	1,30468
SJAG_00843 hypothetical protein	Supercontig_5.1:25	14,0347	34,6425	1,30354
SJAG_02223 HMG box protein	Supercontig_5.1:26	11,0909	27,3641	1,3029
SJAG_01129 P-type proton ATPase Pma1	Supercontig_5.3:10	161,904	399,109	1,30164
SJAG_04886 DUF1720 domain-containing protein	Supercontig_5.2:22	13,2296	32,5583	1,29926
SJAG_02803,SJAG_02804	Supercontig_5.1:15	986,201	2424,43	1,29769
SJAG_01930 transcription factor	Supercontig_5.3:26	7,93434	19,4893	1,2965
SJAG_03903 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	Supercontig_5.2:35	264,635	649,263	1,2948
SJAG_01915 fungal protein	Supercontig_5.3:26	9,59188	23,5146	1,29367
SJAG_05198 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:29	61,7203	151,283	1,29343
SJAG_04129 zf-AN1 type zinc finger protein	Supercontig_5.2:30	246,645	602,232	1,28788
SJAG_02420 TENA/THI family protein	Supercontig_5.1:70	4,20939	10,2443	1,28314
SJAG_01869 NADH/NADPH dependent indole-3-acetaldehyde reductase AKR3	Supercontig_5.3:25	1016,95	2472,44	1,28169
SJAG_00736,SJAG_00737	Supercontig_5.1:27	103,182	250,18	1,27777
SJAG_03909 long-chain-fatty-acid-CoA ligase	Supercontig_5.2:35	109,195	264,398	1,2758
SJAG_04107 fatty acid synthase beta subunit Fas1	Supercontig_5.2:30	111,013	268,011	1,27156
SJAG_03269 hypothetical protein	Supercontig_5.2:75	27,2616	65,7815	1,27081
SJAG_03006 ubiquitin-protein ligase E3 Brl1	Supercontig_5.2:23	22,4743	54,172	1,26927
SJAG_04725 vacuolar membrane amino acid uptake transporter Fnx1	Supercontig_5.3:25	26,146	62,8981	1,26643
SJAG_02785 protein kinase activator	Supercontig_5.1:14	10,6738	25,5998	1,26206
SJAG_01780 metaxin 1	Supercontig_5.3:23	66,8112	160,077	1,2606
SJAG_00823 serine/threonine protein phosphatase	Supercontig_5.1:26	87,2925	208,639	1,25708
SJAG_04573 ubiquitin conjugating enzyme Ubc4	Supercontig_5.3:59	4759,3	11364,7	1,25574
SJAG_03795 ER membrane protein DP1/Yop1	Supercontig_5.2:37	374,701	893,866	1,25432
SJAG_00218 cell wall protein Gas5	Supercontig_5.1:38	130,367	310,656	1,25274

SJAG_00539 U2 snRNP-associated protein Sf3b14	Supercontig_5.1:31	26,5163	62,9979	1,24843
SJAG_01131 19S proteasome regulatory subunit Rpt6	Supercontig_5.3:10	79,5228	188,763	1,24714
SJAG_00415 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.1:33	43,5599	103,363	1,24664
SJAG_00532 iron-sulfur cluster assembly scaffold protein Isu1	Supercontig_5.1:31	316,76	750,797	1,24503
SJAG_01716 cyclin Clg1	Supercontig_5.3:22	56,615	133,963	1,24258
SJAG_02190 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.1:20	7,38037	17,4494	1,24141
SJAG_03145 actin Act1	Supercontig_5.2:51	258,122	607,32	1,23441
SJAG_00409 glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	Supercontig_5.1:34	453,129	1064	1,2315
SJAG_03717,SJAG_03718	Supercontig_5.2:17	288,394	677,124	1,23138
SJAG_00715 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.1:28	15,5511	36,4842	1,23025
SJAG_04663 40S ribosomal protein S4	Supercontig_5.3:40	767,242	1799,89	1,23016
SJAG_01603 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.3:19	39,4649	92,5594	1,22981
SJAG_01451 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.3:16	26,2366	61,2534	1,22321
SJAG_02218 MADS-box transcription factor Mbx1	Supercontig_5.1:26	24,8826	58,0114	1,2212
SJAG_00318 response regulator Mcs4	Supercontig_5.1:35	16,8875	39,2061	1,21512
SJAG_01052 DNAJ domain-containing protein Mdj1	Supercontig_5.1:20	38,4227	88,4149	1,20233
SJAG_04847 60S acidic ribosomal protein Rpp0	Supercontig_5.2:23	1337,04	3060,48	1,19471
SJAG_03373 fructose-bisphosphate aldolase Fba1	Supercontig_5.2:96	494,542	1130,71	1,19306
SJAG_00803 arrestin/PY protein 1	Supercontig_5.1:26	23,9183	54,6462	1,19201
SJAG_02322,SJAG_02323	Supercontig_5.1:40	70,3075	160,394	1,18987
SJAG_01391 ribosome export GTPase	Supercontig_5.3:15	298,301	679,987	1,18874
SJAG_01885 STE/STE20/PAKA protein kinase Sj spesifikus	Supercontig_5.3:25	21,49	48,84	1,1844
SJAG_00249 zinc finger protein Bpb1	Supercontig_5.1:37	35,6286	80,8296	1,18185
SJAG_05750 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.3:23	25,4155	57,5667	1,17952
SJAG_03483 GPI anchored cell surface protein	Supercontig_5.2:11	5,38576	12,1931	1,17884
SJAG_01661 amidophosphoribosyltransferase Ade4	Supercontig_5.3:20	335,721	759,223	1,17726
SJAG_04082,SJAG_04083	Supercontig_5.2:31	15,2692	34,5061	1,17623
SJAG_04172 DUF3210 family protein	Supercontig_5.2:29	25,8294	58,324	1,17508
SJAG_03221 Swi5 protein	Supercontig_5.2:66	14,1689	31,9827	1,17457
SJAG_03202 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.2:62	36,223	81,6848	1,17316
SJAG_01290 cell wall protein Gas1	Supercontig_5.3:13	507,775	1144,97	1,17305
SJAG_03250 sorting receptor for ubiquitinated membrane protein	Supercontig_5.2:71	33,9658	76,4904	1,1712
SJAG_00726 60S ribosomal protein L28/L44	Supercontig_5.1:27	3141,95	7070,65	1,17018
SJAG_01011,SJAG_01012	Supercontig_5.1:21	96,6153	216,89	1,16664
SJAG_00531 U4/U6 X U5 tri-snRNP complex subunit Prp4 family protein	Supercontig_5.1:31	9,12484	20,3821	1,15943
SJAG_01595 guanosine-diphosphatase Gda1	Supercontig_5.3:19	97,3056	217,186	1,15834
SJAG_00047 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.1:41	63,1573	140,872	1,15737
SJAG_01345 pheromone M-factor receptor Map3	Supercontig_5.3:14	85,084	189,696	1,15673
SJAG_02047 TENA/THI domain-containing protein	Supercontig_5.3:28	13,3324	29,714	1,15621
SJAG_02133 amino acid permease Sj spesifikus	Supercontig_5.1:62	1,03266	2,30047	1,15557
SJAG_02334 XP-A family Rhp14	Supercontig_5.1:51	135,019	300,656	1,15495
SJAG_03538,SJAG_03539	Supercontig_5.2:13	75,4784	168,032	1,1546
SJAG_01448 boi family protein	Supercontig_5.3:16	21,9228	48,7849	1,15401

SJAG_01606 60S ribosomal protein L7	Supercontig_5.3:19	263,954	586,255	1,15124
SJAG_00280 fungal protein	Supercontig_5.1:36	163,576	363,245	1,15098
SJAG_02421 TENA/THI family protein	Supercontig_5.1:70	37,0023	82,0956	1,14969
SJAG_00293,SJAG_05413,SJAG_05414	Supercontig_5.1:36	224,084	496,629	1,14813
SJAG_00107 YjgF family protein Mmf1	Supercontig_5.1:40	300,321	665,179	1,14723
SJAG_00387 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:34	21,0961	46,7	1,14645
SJAG_03943 acyl-coA desaturase	Supercontig_5.2:34	273,032	604,269	1,14612
SJAG_03246 guanyl-nucleotide exchange factor Sec73	Supercontig_5.2:70	12,3886	27,4008	1,14521
SJAG_03689,SJAG_03690	Supercontig_5.2:16	142,004	315,099	1,14487
SJAG_01608,SJAG_01610	Supercontig_5.3:19	1108,78	2440,51	1,14352
SJAG_00283 pyridoxine biosynthesis protein	Supercontig_5.1:36	201,204	444,137	1,14235
SJAG_02521 ubiquitin-protein ligase E3	Supercontig_5.1:89	18,2439	40,2355	1,14106
SJAG_04665 ribonucleoside reductase large subunit Cdc22	Supercontig_5.3:39	42,2915	93,2041	1,14003
SJAG_00993 STE/STE7/MEK1 protein kinase Byr1	Supercontig_5.1:22	40,8896	90,0075	1,13831
SJAG_03361 rho GDP dissociation inhibitor Rdi1	Supercontig_5.2:94	296,843	653,121	1,13765
SJAG_03335 60S ribosomal protein L18	Supercontig_5.2:88	2257,28	4960,34	1,13585
SJAG_04673 thiamine transporter Thi9	Supercontig_5.3:37	39,6189	87,0516	1,13568
SJAG_04381 negative regulator-MBF	Supercontig_5.2:25	15,7007	34,4357	1,13307
SJAG_00994 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:22	26,242	57,4299	1,12992
SJAG_04326 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.2:26	645,225	1411,66	1,12952
SJAG_03961 5-aminolevulinat synthase	Supercontig_5.2:33	72,3945	158	1,12597
SJAG_00597 ATP-dependent RNA helicase Prp43	Supercontig_5.1:30	40,2703	87,5098	1,11973
SJAG_05277 cytidyltransferase	Supercontig_5.1:14	26,5628	57,4613	1,11318
SJAG_03969 hypothetical protein	Supercontig_5.2:33	76,5323	165,438	1,11215
SJAG_03536 SNARE Psy1	Supercontig_5.2:12	93,475	201,984	1,11159
SJAG_04228 DNAJ domain-containing protein	Supercontig_5.2:28	17,3298	37,4126	1,11027
SJAG_00304 transcription factor Rsv2	Supercontig_5.1:5	67,0705	144,72	1,10947
SJAG_04579 nucleotide-sugar phosphatase	Supercontig_5.3:58	207,52	447,704	1,10929
SJAG_00921 60S ribosomal protein L26	Supercontig_5.1:23	5064,05	10918,2	1,10837
SJAG_04553 copper chaperone Sco1	Supercontig_5.3:63	32,0373	69,0627	1,10815
SJAG_02168 mannosyltransferase	Supercontig_5.1:14	77,4441	166,791	1,10681
SJAG_02850 adenylosuccinate lyase Ade8	Supercontig_5.1:15	55,2692	118,942	1,10571
SJAG_00192 F-box/WD repeat protein Pof1	Supercontig_5.1:38	36,2524	77,8869	1,1033
SJAG_02096 thyroid receptor interacting protein	Supercontig_5.3:30	18,7925	40,3653	1,10296
SJAG_02081 60S ribosomal protein L38	Supercontig_5.3:29	7942,5	17054,4	1,10248
SJAG_02613 DUF1769 family protein	Supercontig_5.1:10	60,5606	129,988	1,10193
SJAG_01296 40S ribosomal protein S19	Supercontig_5.3:13	2050,22	4377,73	1,0944
SJAG_02910 UNC-50 family protein	Supercontig_5.1:17	14,0246	29,9448	1,09435
SJAG_02602 M-factor transporter Mam1	Supercontig_5.1:10	16,4598	35,0992	1,09249
SJAG_03275 GTP cyclohydrolase	Supercontig_5.2:76	171,324	364,459	1,08903
SJAG_02842 sphingosine N-acyltransferase Lac1	Supercontig_5.1:15	204,577	434,145	1,08554
SJAG_04506 myo-inositol transporter Itr1	Supercontig_5.3:72	59,8691	127,048	1,08549
SJAG_01417 monothiol glutaredoxin Grx5	Supercontig_5.3:15	53,0405	112,398	1,08345

SJAG_01714 cyclophilin family peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Cyp2	Supercontig_5.3:22	1471,4	3117,01	1,08297
SJAG_04911 U1 snRNP-associated protein Usp102	Supercontig_5.2:22	16,1265	34,1601	1,08288
SJAG_00456 hypothetical protein	Supercontig_5.1:33	202,923	429,442	1,08153
SJAG_00435 mRNA processing protein	Supercontig_5.1:33	15,1897	32,0936	1,0792
SJAG_04535,SJAG_05333	Supercontig_5.3:67	33,0358	69,6925	1,07697
SJAG_00899 SNARE Ykt6	Supercontig_5.1:24	125,601	264,701	1,07551
SJAG_04983 inner membrane transport protein yieO !!! Érdekes!!! BLA	Supercontig_5.2:20	14,3384	30,1968	1,07452
SJAG_00630 ketoreductase	Supercontig_5.1:29	63,0979	132,882	1,07448
SJAG_02662 U3 snoRNP-associated protein Utp16	Supercontig_5.1:12	1,60561	3,37785	1,07298
SJAG_02921 cAMP-independent regulatory protein Pac2	Supercontig_5.1:17	37,0981	77,9441	1,07109
SJAG_01764 U3 snoRNP-associated protein Nan1	Supercontig_5.3:23	51,8683	108,951	1,07076
SJAG_02839 lectin family glycoprotein receptor	Supercontig_5.1:15	57,992	121,727	1,06972
SJAG_02085 sphingosine N-acyltransferase Lag1	Supercontig_5.3:29	28,5149	59,6994	1,066
SJAG_02418 HDEL receptor	Supercontig_5.1:69	116,534	243,46	1,06293
SJAG_02202 hypothetical protein	Supercontig_5.1:22	37,8138	78,9837	1,06264
SJAG_05233 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:16	19,7714	41,2893	1,06235
SJAG_04990 ubiquitin-protein ligase E3	Supercontig_5.2:20	49,4708	102,964	1,0575
SJAG_01942 PEK protein kinase Hri1	Supercontig_5.3:26	25,3292	52,6508	1,05565
SJAG_02848 dynamin Dnm1	Supercontig_5.1:15	26,6772	55,4334	1,05515
SJAG_02585 40S ribosomal protein S24	Supercontig_5.1:10	3294,29	6842,17	1,05449
SJAG_04483 sporulation specific 1,3-beta- glucanosyltransferase Gas4	Supercontig_5.3:78	83,2751	172,948	1,05438
SJAG_01781 eukaryotic protein	Supercontig_5.3:23	83,8836	174,079	1,05328
SJAG_01803 zinc ion transporter Zhf1	Supercontig_5.3:23	176,183	363,497	1,04487
SJAG_03748 rho-type GTPase activating protein Rga8	Supercontig_5.2:17	36,3835	74,904	1,04176
SJAG_01013 nucleoporin Nup146	Supercontig_5.1:21	26,4869	54,3574	1,0372
SJAG_00528 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:31	52,165	106,857	1,03453
SJAG_02012 GTPase activating protein Gyp51	Supercontig_5.3:28	27,009	55,2988	1,03381
SJAG_03975 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:33	3,08206	6,30318	1,03218
SJAG_01200 splicing factor Slu7	Supercontig_5.3:11	10,8026	22,083	1,03155
SJAG_04184 alpha-1,3-glucan synthase Mok13	Supercontig_5.2:29	5,49688	11,2359	1,03143
SJAG_03941 histone H2B alpha Htb1	Supercontig_5.2:34	608,014	1241,89	1,03036
SJAG_00166 60S ribosomal protein L35a	Supercontig_5.1:39	2317,87	4720	1,02598
SJAG_02761 centrosomal transforming acidic coiled-coil protein Alp7	Supercontig_5.1:14	11,365	23,1241	1,0248
SJAG_03816 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:37	24,6988	50,1982	1,0232
SJAG_02461,SJAG_02462	Supercontig_5.1:78	536,02	1089,34	1,0231
SJAG_00988 glutamate-cysteine ligase Gcs1	Supercontig_5.1:22	92,922	188,219	1,01832
SJAG_01785 hypothetical protein	Supercontig_5.3:23	16,3964	33,1991	1,01776
SJAG_00118 medial ring protein Mid2	Supercontig_5.1:40	54,619	110,565	1,01742
SJAG_00058 U1 snRNP-associated protein Usp105	Supercontig_5.1:41	35,1324	71,0698	1,01644
SJAG_02622 YTH family protein Mmi1	Supercontig_5.1:11	41,6613	84,1946	1,01502
SJAG_02009,SJAG_02010	Supercontig_5.3:28	3968,19	8014,42	1,01412
SJAG_01531 alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase	Supercontig_5.3:18	217,965	439,951	1,01325
SJAG_02390 translation initiation factor eIF5	Supercontig_5.1:63	421,265	850,128	1,01295

SJAG_00421 TATA-binding protein	Supercontig_5.1:33	553,527	1116,63	1,01242
SJAG_02792 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:14	31,8736	64,2258	1,01079
SJAG_04055 heat shock protein S	Supercontig_5.2:31	1327,97	2674,22	1,00999
SJAG_00288 protein disulfide isomerase	Supercontig_5.1:36	510,579	1027,03	1,00827
SJAG_00503,SJAG_05189	Supercontig_5.1:32	685,563	1377,88	1,00709
SJAG_04073 KRE9 family cell wall biosynthesis protein	Supercontig_5.2:31	54,5391	109,538	1,00607
SJAG_01983 PTR family peptide transporter	Supercontig_5.3:27	17,1353	34,3969	1,00531
SJAG_05000 RACK1 Cpc2	Supercontig_5.2:20	1814,06	3638,68	1,0042
SJAG_01738 Tea1 anchoring protein Mod5	Supercontig_5.3:22	37,6538	75,4536	1,00279
SJAG_02328 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:50	11,7362	23,501	1,00176
SJAG_01411 60S acidic ribosomal protein Rpp1-1	Supercontig_5.3:15	1710	3423,54	1,00149
SJAG_00779 uridylate kinase	Supercontig_5.1:26	46,6017	93,1172	0,998665
SJAG_00825 phosphatidylethanolamine N-methyltransferase Cho2	Supercontig_5.1:25	32,7421	65,4152	0,998479
SJAG_03880 carbohydrate kinase	Supercontig_5.2:35	63,6855	127,103	0,996965
SJAG_03109 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:44	45,2422	90,2109	0,995633
SJAG_04498 hypothetical protein	Supercontig_5.3:74	9,25572	18,4459	0,994881
SJAG_01671 succinate dehydrogenase Sdh1	Supercontig_5.3:21	22,5955	44,994	0,993695
SJAG_02389 NLI interacting factor family phosphatase	Supercontig_5.1:63	46,9762	93,4681	0,992544
SJAG_02217 group I intron splicing factor	Supercontig_5.1:26	11,8645	23,602	0,992263
SJAG_03785 ATP-binding cassette transporter abc1	Supercontig_5.2:37	15,7287	31,2517	0,990533
SJAG_03542 histone H4 h4.2 nagyon érdekes a Blast!!!	Supercontig_5.2:13	947,155	1881,37	0,990112
SJAG_02412 hypothetical protein	Supercontig_5.1:68	107,786	213,897	0,988739
SJAG_00221 2 OG-Fe(II) oxygenase superfamily protein Ofd2	Supercontig_5.1:37	33,9746	67,4017	0,988328
SJAG_01821 Shk1 kinase binding protein 15	Supercontig_5.3:24	59,2764	117,196	0,983398
SJAG_04383 serpine1 like protein	Supercontig_5.2:25	723,652	1430,28	0,982925
SJAG_01788 fungal protein	Supercontig_5.3:23	126,544	250,037	0,982506
SJAG_00940 60S ribosomal protein L17	Supercontig_5.1:23	1718,35	3394,19	0,98204
SJAG_03423 60S ribosomal protein L13	Supercontig_5.2:10	861,345	1700,33	0,981155
SJAG_05288 meiotic forkhead transcription factor Mei4	Supercontig_5.2:34	4,51668	8,91518	0,981001
SJAG_01684 hsp10-like protein	Supercontig_5.3:21	894,616	1765,81	0,980991
SJAG_03637 morphogenesis protein Mor2	Supercontig_5.2:15	14,7813	29,1679	0,980611
SJAG_01366 40S ribosomal protein S26	Supercontig_5.3:14	2016,39	3968,11	0,976679
SJAG_02492 fungal protein	Supercontig_5.1:84	23,338	45,9196	0,976432
SJAG_00069 40S ribosomal protein S11	Supercontig_5.1:41	2746,34	5398,69	0,975098
SJAG_01217,SJAG_01218	Supercontig_5.3:11	99,3198	195,152	0,974447
SJAG_03859 40S ribosomal protein S6	Supercontig_5.2:36	1334,85	2621,69	0,973821
SJAG_05335 CUE domain-containing protein	Supercontig_5.3:52	66,6526	130,728	0,971841
SJAG_00284 multidomain vesicle coat component Sec16	Supercontig_5.1:36	14,2834	27,9695	0,969512
SJAG_00790 heat shock protein BIP	Supercontig_5.1:26	221,138	431,949	0,965916
SJAG_01498 zf-CCHC type zinc finger protein	Supercontig_5.3:17	55,1301	107,444	0,962669
SJAG_04166 Cdc25 family phosphatase Ibp1	Supercontig_5.2:29	23,4757	45,7287	0,96193
SJAG_02369 hypothetical protein Sj-ban 3x annyi van!	Supercontig_5.1:58	94,6377	184,25	0,961177
SJAG_00320 small histone ubiquitination factor Shf1	Supercontig_5.1:35	45,4278	88,3268	0,959277

SJAG_04949 Srp1 family splicing factor	Supercontig_5.2:21	31,1675	15,5769	-1,00063
SJAG_04698,SJAG_04699	Supercontig_5.3:31	79,6672	39,7847	-1,00177
SJAG_04180 fungal protein	Supercontig_5.2:29	61,9571	30,9257	-1,00246
SJAG_01163 TatD protein	Supercontig_5.3:10	25,6093	12,7718	-1,00371
SJAG_03692 hypothetical protein	Supercontig_5.2:16	29,0898	14,5071	-1,00376
SJAG_04301 beta-fructofuranosidase-like protein//invertase	Supercontig_5.2:26	541,7	269,722	-1,00602
SJAG_01762 MCM complex subunit Mcm3	Supercontig_5.3:23	45,7579	22,7628	-1,00734
SJAG_02093 lysophospholipase//phospholipase	Supercontig_5.3:29	99,1574	49,3044	-1,008
SJAG_04339 ribosome biogenesis protein	Supercontig_5.2:25	125,284	62,213	-1,00991
SJAG_03148 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:52	9,22343	4,57914	-1,01023
SJAG_01434 hypothetical protein	Supercontig_5.3:16	19,0068	9,41828	-1,01298
SJAG_01955,SJAG_01956,SJAG_01957	Supercontig_5.3:26	221,166	109,557	-1,01345
SJAG_04317 cardiolipin synthase/hydrolase fusion protein	Supercontig_5.2:26	41,8728	20,7364	-1,01385
SJAG_05181 glutathione S-transferase Gst3	Supercontig_5.1:39	2031,89	1005,23	-1,01529
SJAG_00618 DNA polymerase alpha accessory factor Mcl1	Supercontig_5.1:29	27,529	13,6159	-1,01566
SJAG_05033 short chain dehydrogenase	Supercontig_5.2:19	450,437	222,576	-1,01703
SJAG_00553 transporter Tvp23//hypothetical protein	Supercontig_5.1:31	72,2119	35,6585	-1,01799
SJAG_04243 hypothetical protein	Supercontig_5.2:27	1292,59	637,925	-1,0188
SJAG_04421 transcription factor	Supercontig_5.2:24	12,5751	6,20191	-1,01978
SJAG_04786 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:13	15,4454	7,61611	-1,02006
SJAG_02695 CLIP170 family protein Tip1	Supercontig_5.1:12	55,4757	27,3386	-1,02092
SJAG_01936 SMR domain-containing protein	Supercontig_5.3:26	71,7484	35,3445	-1,02146
SJAG_02298 AP-endonuclease Apn2	Supercontig_5.1:44	29,9279	14,737	-1,02204
SJAG_00389 hypothetical protein	Supercontig_5.1:34	424,443	208,869	-1,02297
SJAG_01064 nuclear cap-binding complex small subunit	Supercontig_5.1:20	27,1399	13,3516	-1,02341
SJAG_03219 SCF ubiquitin ligase complex subunit Skp1	Supercontig_5.2:66	86,5308	42,4717	-1,02671
SJAG_03408,SJAG_03409	Supercontig_5.2:10	91,3133	44,7756	-1,02811
SJAG_04094 aspartate-tRNA ligase	Supercontig_5.2:31	10,1708	4,9865	-1,02833
SJAG_03301 RNA-binding splicing factor	Supercontig_5.2:82	34,4971	16,9124	-1,0284
SJAG_02776 pig-U	Supercontig_5.1:14	17,893	8,76808	-1,02906
SJAG_01063 NADPH-adrenodoxin reductase Arh1	Supercontig_5.1:20	40,8824	20,0324	-1,02914
SJAG_00934 cryptic loci regulator Clr1	Supercontig_5.1:23	18,0172	8,82591	-1,02956
SJAG_00276 triose phosphate transporter	Supercontig_5.1:36	22,3547	10,9385	-1,03117
SJAG_06613 RNaseP RNase MRP subunit Pop6	Supercontig_5.2:28	64,3948	31,4923	-1,03195
SJAG_01428,SJAG_01429: BRCT domain-containing protein	Supercontig_5.3:16	291,568	142,42	-1,03368
SJAG_01220 hypothetical protein// UPF0103 family protein	Supercontig_5.3:11	87,8869	42,8113	-1,03766
SJAG_04362,SJAG_04363: glucosidase I Gls1	Supercontig_5.2:25	257,704	125,267	-1,0407
SJAG_03428 zf-CHY type zinc finger protein	Supercontig_5.2:10	32,8745	15,9716	-1,04146
SJAG_03304 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:83	19,859	9,63982	-1,04272
SJAG_00640 Mre11 complex subunit Nbs1 (intra S checkpoint)	Supercontig_5.1:29	10,3786	5,03639	-1,04315
SJAG_04514 metallopeptidase Oma1	Supercontig_5.3:70	21,7748	10,5615	-1,04385
SJAG_03921 DNA-directed RNA polymerase III complex subunit Rpc37	Supercontig_5.2:34	149,234	72,3406	-1,0447
SJAG_04432,SJAG_04434	Supercontig_5.2:23	215,849	104,442	-1,04733

SJAG_04515 UPF0136 family protein// hypothetical protein	Supercontig_5.3:70	181,3	87,6912	-1,04788
SJAG_01543 pyridoxal reductase// pyridoxal reductase Plr1	Supercontig_5.3:18	386,979	187,156	-1,04802
SJAG_00105 ribosomal protein subunit L51-b	Supercontig_5.1:40	26,05	12,5803	-1,05011
SJAG_03279,SJAG_03280	Supercontig_5.2:77	43,3173	20,9154	-1,05038
SJAG_04635 translation initiation factor	Supercontig_5.3:46	11,1136	5,36074	-1,05182
SJAG_00429 hypothetical protein	Supercontig_5.1:33	6,27201	3,02435	-1,0523
SJAG_00344 ribosome biogenesis protein Tsr1	Supercontig_5.1:35	220,23	106,172	-1,05261
SJAG_00757 RecA family ATPase Rhp57	Supercontig_5.1:27	6,98093	3,3612	-1,05444
SJAG_04032,SJAG_04033,SJAG_04034	Supercontig_5.2:32	150,642	72,4975	-1,05512
SJAG_02528, SJAG_02529: sporulation specific protein Spo13	Supercontig_5.1:90	35,444	17,0087	-1,05927
SJAG_05607 hypothetical protein	Supercontig_5.3:11	9,37147	4,49067	-1,06134
SJAG_02647 cycloisomerase 2 family protein	Supercontig_5.1:11	120,381	57,6591	-1,06199
SJAG_00117 stress activated MAP kinase interacting protein Sin1	Supercontig_5.1:40	34,1908	16,3598	-1,06346
SJAG_02247 coenzyme A diphosphatase	Supercontig_5.1:31	36,8321	17,6234	-1,06347
SJAG_02374 Dhp1p-interacting protein Din1	Supercontig_5.1:59	28,3285	13,5527	-1,06367
SJAG_02170,SJAG_02171,SJAG_02172	Supercontig_5.1:15	70,4085	33,6439	-1,0654
SJAG_01704 ATP(CTP) tRNA nucleotidyltransferase	Supercontig_5.3:21	53,6511	25,6366	-1,0654
SJAG_00698 CCAAT-binding factor complex subunit Php2	Supercontig_5.1:28	66,7513	31,8934	-1,06554
SJAG_00973 cyclin L family cyclin	Supercontig_5.1:22	66,0887	31,5515	-1,06669
SJAG_04428 hypothetical protein// sequence orphan csak pome és	Supercontig_5.2:24	34,4514	16,4461	-1,06682
SJAG_04518 hsp90-like protein	Supercontig_5.3:70	121,815	57,999	-1,0706
SJAG_00168 CDP-diaclyglycerol-glycerol-3-phosphate3-phosphatidyltransferase	Supercontig_5.1:39	19,911	9,47925	-1,07072
SJAG_03948 ATPase	Supercontig_5.2:34	15,5732	7,40991	-1,07153
SJAG_04136 ammonium transporter Amt1	Supercontig_5.2:30	53,7959	25,5917	-1,07182
SJAG_00198 ATP-dependent DNA ligase Cdc17	Supercontig_5.1:38	7,63125	3,6236	-1,07449
SJAG_03491 integral inner nuclear membrane protein Ima1	Supercontig_5.2:11	50,5217	23,9773	-1,07523
SJAG_02954 galactose-1-phosphate uridylyltransferase Gal7	Supercontig_5.2:12	135,607	64,279	-1,07701
SJAG_03832 condensin complex subunit Cut14	Supercontig_5.2:36	14,9942	7,10192	-1,07813
SJAG_01177,SJAG_01178 NST UDP-galactose transporter;	Supercontig_5.3:11	172,611	81,7481	-1,07826
SJAG_03437 DASH complex subunit Dad3	Supercontig_5.2:10	27,3022	12,9164	-1,07981
SJAG_00471 nucleoporin Nup85	Supercontig_5.1:32	41,4688	19,6045	-1,08085
SJAG_04640,SJAG_04641,SJAG_04643	Supercontig_5.3:44	90,3941	42,7063	-1,08178
SJAG_04288 dephospho-CoA kinase	Supercontig_5.2:27	60,5551	28,5468	-1,08492
SJAG_01517 translation protein	Supercontig_5.3:17	19,488	9,16673	-1,08811
SJAG_03911 transcription factor Rsv1	Supercontig_5.2:34	33,5479	15,7784	-1,08827
SJAG_02604 GTP binding protein	Supercontig_5.1:10	108,851	50,9091	-1,09636
SJAG_00783 NuA4 histone acetyltransferase complex subunit Vid21	Supercontig_5.1:26	9,02195	4,21465	-1,09803
SJAG_00585 transcription factor tfiic complex subunit sfc6	Supercontig_5.1:30	26,3796	12,2673	-1,1046
SJAG_02646 cytochrome c1 Cyt1	Supercontig_5.1:11	91,7022	42,6271	-1,10519
SJAG_04710 DUF1688 family protein	Supercontig_5.3:29	30,5001	14,1774	-1,10522
SJAG_02429 sphingoid long chain base kinase	Supercontig_5.1:72	128,426	59,6604	-1,10609
SJAG_00601,SJAG_05195	Supercontig_5.1:30	32,3529	15,006	-1,10835
SJAG_00006 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:42	9,1541	4,24193	-1,1097

SJAG_01419 MutS protein 3	Supercontig_5.3:15	16,0232	7,41547	-1,11155
SJAG_04984,SJAG_04985,SJAG_04986,SJAG_05351,SJAG_06560 hypothetical protein	Supercontig_5.2:20	138,252	63,9513	-1,11225
SJAG_04043,SJAG_00903: ChaC like protein	Supercontig_5.1:24	184,575	85,3672	-1,11245
SJAG_04065 tRNA pseudouridine synthase	Supercontig_5.2:31	53,6409	24,8004	-1,11297
SJAG_04043 hypothetical protein	Supercontig_5.2:32	52,0162	24,0275	-1,11427
SJAG_02720,SJAG_02721	Supercontig_5.1:13	101,584	46,9078	-1,11478
SJAG_02728 fungal protein	Supercontig_5.1:13	136,338	62,8614	-1,11694
SJAG_03599 SAGA complex subunit Sgf11	Supercontig_5.2:14	35,0817	16,1642	-1,11791
SJAG_05246 hypothetical protein Sj specific	Supercontig_5.3:23	27,5254	12,665	-1,11991
SJAG_02629 histone acetyltransferase complex subunit Nto1	Supercontig_5.1:11	27,9962	12,8647	-1,12181
SJAG_03799 CAMKK/META protein kinase Ppk34	Supercontig_5.2:37	18,7274	8,59971	-1,12279
SJAG_00363 ww domain binding protein 11	Supercontig_5.1:34	22,4691	10,2871	-1,1271
SJAG_03734 DNA 5' exonuclease	Supercontig_5.2:17	41,6399	19,0197	-1,13047
SJAG_04576,SJAG_04577	Supercontig_5.3:58	142,096	64,8426	-1,13185
SJAG_01703 TORC1 subunit Tco89	Supercontig_5.3:21	47,0703	21,4222	-1,13571
SJAG_00388 hypothetical protein Sj specific	Supercontig_5.1:34	8,32427	3,78417	-1,13735
SJAG_01020,SJAG_01030: alpha-amylase Aah2;guanyl nucleotide exchar	Supercontig_5.1:21	20,9835	9,53822	-1,13746
SJAG_01804 Clr6 histone deacetylase complex subunit Pst2	Supercontig_5.3:23	16,5528	7,51723	-1,1388
SJAG_03805 ski complex TPR repeat subunit Ski3	Supercontig_5.2:37	11,1902	5,07008	-1,14215
SJAG_02607 replication licensing factor Cdt1	Supercontig_5.1:10	28,9041	13,0797	-1,14394
SJAG_04845 riboflavin kinase Fmn1	Supercontig_5.2:23	36,3046	16,4148	-1,14516
SJAG_02348 MCM complex subunit Mcm2	Supercontig_5.1:54	39,9266	18,0397	-1,14618
SJAG_04212 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.2:28	262,112	118,427	-1,14618
SJAG_01407 niemann-Pick disease type C2 protein hE1	Supercontig_5.3:15	520,022	234,684	-1,14786
SJAG_01907 U3 snoRNP-associated protein Utp3	Supercontig_5.3:25	130,687	58,9774	-1,14788
SJAG_04916 RNase P and RNase MRP subunit p30	Supercontig_5.2:22	32,0697	14,4535	-1,14979
SJAG_05196 spindle pole body protein Sad1	Supercontig_5.1:30	14,1961	6,39779	-1,14985
SJAG_05321 hypothetical protein	Supercontig_5.2:30	84,7661	38,1575	-1,15152
SJAG_00380 vacuolar protein sorting-associated protein Vps41	Supercontig_5.1:34	9,07958	4,08497	-1,1523
SJAG_02182 DNA replication factor C complex subunit Rfc3	Supercontig_5.1:17	44,3093	19,9245	-1,15306
SJAG_00145 RNA binding protein mei2 (ste11 szabályozza)	Supercontig_5.1:39	112,687	50,6597	-1,15341
SJAG_01887 DNA repair protein Rhp41	Supercontig_5.3:25	21,5638	9,69154	-1,15381
SJAG_01001 Erd1	Supercontig_5.1:21	18,8379	8,46368	-1,15428
SJAG_04677,SJAG_04678,SJAG_04679: iron transport multicopper oxidase	Supercontig_5.3:36	343,568	153,986	-1,15779
SJAG_03935 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase	Supercontig_5.2:34	86,7301	38,8659	-1,15803
SJAG_01890 S-adenosylmethionine transporter	Supercontig_5.3:25	24,2396	10,8545	-1,15908
SJAG_06514 endoplasmic reticulum membrane protein	Supercontig_5.3:58	64,5594	28,8924	-1,15994
SJAG_04533 metalloendopeptidase	Supercontig_5.3:67	15,8575	7,08267	-1,1628
SJAG_00091 fungal protein	Supercontig_5.1:40	20,2939	9,05413	-1,1644
SJAG_03380 actin cortical patch component Aip1	Supercontig_5.2:98	71,3347	31,7913	-1,16597
SJAG_05032 SUMO E1-like activator enzyme Rad31	Supercontig_5.2:19	36,1987	16,1044	-1,16848
SJAG_03096,SJAG_03098,SJAG_03099 hypothetical protein	Supercontig_5.2:42	97,9465	43,5202	-1,17031
SJAG_01841,SJAG_01842 ferrochelatase; membrane transporter	Supercontig_5.3:24	99,1429	43,9553	-1,17347

SJAG_03541 fungal protein	Supercontig_5.2:13	25,1908	11,1563	-1,17504
SJAG_04777 STE/STE11 protein kinase	Supercontig_5.3:14	57,6	25,5091	-1,17506
SJAG_04712 transcription factor	Supercontig_5.3:29	17,9648	7,95231	-1,17573
SJAG_04007 fungal protein	Supercontig_5.2:33	110,276	48,8013	-1,17613
SJAG_04513 SNARE Bos1	Supercontig_5.3:71	25,0722	11,0604	-1,18068
SJAG_03510 hypothetical protein Sj specific	Supercontig_5.2:12	50,2855	22,1413	-1,1834
SJAG_04959,SJAG_04960	Supercontig_5.2:21	51,9553	22,8712	-1,18374
SJAG_04790 triglyceride lipase-cholesterol esterase	Supercontig_5.3:12	45,5059	20,0111	-1,18525
SJAG_03121 rhomboid protease	Supercontig_5.2:46	24,2254	10,6409	-1,18689
SJAG_01958,SJAG_01959	Supercontig_5.3:26	2666,73	1170,63	-1,18779
SJAG_01830 fungal protein	Supercontig_5.3:24	38,8918	17,0677	-1,1882
SJAG_03476 NADPH quinone oxidoreductase/ARE-binding protein	Supercontig_5.2:11	91,8912	40,3262	-1,18821
SJAG_02538 hypothetical protein Sj specific	Supercontig_5.1:93	19,1303	8,39414	-1,1884
SJAG_00004 CAMK/CAMKL/MARK protein kinase	Supercontig_5.1:42	44,6251	19,5686	-1,18932
SJAG_02082 SUMO conjugating enzyme Hus5	Supercontig_5.3:29	82,2077	36,0115	-1,19082
SJAG_00099 Delta(12) fatty acid desaturase	Supercontig_5.1:40	49,0862	21,4962	-1,19124
SJAG_01771 transcription coactivator PC4	Supercontig_5.3:23	42,2176	18,4005	-1,1981
SJAG_04370, SJAG_04371,SJAG_04372 Pku80; DNAJ/TPR domain-contai	Supercontig_5.2:25	117,735	51,2929	-1,19872
SJAG_02623 short chain dehydrogenase	Supercontig_5.1:11	398,382	173,44	-1,19971
SJAG_02868 S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	Supercontig_5.1:16	43,6174	18,9742	-1,20087
SJAG_00851 kinesin-like protein Tea2	Supercontig_5.1:25	14,2635	6,17834	-1,20704
SJAG_00856 gamma tubulin complex subunit Gfh1	Supercontig_5.1:25	32,5578	14,0895	-1,20839
SJAG_00780 hypothetical protein Sj specific	Supercontig_5.1:26	1,59416	0,6891	-1,21002
SJAG_00955 RNase P subunit	Supercontig_5.1:23	30,1785	13,0159	-1,21325
SJAG_01408 cell division control protein Cdc5	Supercontig_5.3:15	37,4484	16,131	-1,21507
SJAG_01619 hypothetical protein S pombe-ban nincs meg	Supercontig_5.3:20	167,562	72,0212	-1,21821
SJAG_03966,SJAG_06284	Supercontig_5.2:33	88,7989	38,0547	-1,22247
SJAG_01146 histone lysine methyltransferase Set9	Supercontig_5.3:10	4,97303	2,12762	-1,22489
SJAG_02288 tRNA nucleotidyltransferase	Supercontig_5.1:41	11,2551	4,80297	-1,22858
SJAG_00510,SJAG_00512,SJAG_00513 sj specific hypothetical protein	Supercontig_5.1:32	59,5379	25,4019	-1,22887
SJAG_02619,SJAG_02620,SJAG_02621	Supercontig_5.1:11	174,761	74,5423	-1,22925
SJAG_04879 DNA polymerase epsilon subunit Dpb4	Supercontig_5.2:22	30,8761	13,1439	-1,2321
SJAG_01539 NADH dehydrogenase	Supercontig_5.3:18	114,035	48,4441	-1,23508
SJAG_01010 DNA replication factor C complex subunit Rfc2	Supercontig_5.1:21	33,0115	13,9984	-1,23771
SJAG_00048,SJAG_00049,SJAG_00052	Supercontig_5.1:41	374,678	158,872	-1,23778
SJAG_04264,SJAG_04265	Supercontig_5.2:27	54,1466	22,925	-1,23995
SJAG_06425 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.2:23	20,5833	8,70907	-1,24088
SJAG_04312 cAMP dependent Protein kinase A catalytic subunit pka1	Supercontig_5.2:1	206,524	87,348	-1,24146
SJAG_04867 ferrous iron transporter Pcl1	Supercontig_5.2:23	25,8154	10,918	-1,24153
SJAG_00524 prefoldin subunit 4	Supercontig_5.1:31	38,6376	16,3261	-1,24283
SJAG_04539 thioredoxin-like I protein Tx1	Supercontig_5.3:66	43,3933	18,3343	-1,24293
SJAG_04000 monooxygenase Coq6	Supercontig_5.2:33	9,98668	4,21334	-1,24504
SJAG_00767,SJAG_00768	Supercontig_5.1:27	157,873	66,5556	-1,24613

SJAG_04943 two-component GAP Byr4	Supercontig_5.2:21	55,2784	23,3036	-1,24616
SJAG_00033 neddylation protein Dcn1	Supercontig_5.1:41	38,1442	16,0569	-1,24827
SJAG_00486 CDC7 protein kinase Spo4	Supercontig_5.1:32	133,805	56,251	-1,25018
SJAG_00797 ATP synthase complex assembly protein Atp25	Supercontig_5.1:26	17,5202	7,3594	-1,25136
SJAG_01534,SJAG_01535	Supercontig_5.3:18	84,5976	35,5071	-1,25251
SJAG_01952,SJAG_01953 mediator complex subunit Pmc3/Med27	Supercontig_5.3:26	41,4033	17,3734	-1,25287
SJAG_00577 U2 snRNP-associated protein sap61	Supercontig_5.1:30	19,7177	8,27119	-1,25332
SJAG_05031 CTNS domain-containing protein	Supercontig_5.2:19	106,593	44,7023	-1,25369
SJAG_04870 diadenosine 5',5'''-p1,p6-hexaphosphate hydrolase Aps1	Supercontig_5.2:23	75,5252	31,5902	-1,25748
SJAG_01111 hypothetical protein	Supercontig_5.31:2	31,4123	13,1154	-1,26007
SJAG_02950 galactokinase Gal1	Supercontig_5.2:11	470,051	196,201	-1,26048
SJAG_02063,SJAG_02064	Supercontig_5.3:29	38,2434	15,9544	-1,26125
SJAG_02373 DNA replication factor C complex subunit Ctf8	Supercontig_5.1:59	36,7172	15,3135	-1,26165
SJAG_00832 sulfatase modifying factor 1	Supercontig_5.1:25	51,1737	21,3222	-1,26305
SJAG_01739,SJAG_01740	Supercontig_5.3:22	180,258	75,0656	-1,26384
SJAG_03217 hypothetical protein	Supercontig_5.2:65	49,6385	20,6578	-1,26477
SJAG_04496 WDR24 family WD repeat protein	Supercontig_5.3:76	18,7593	7,79339	-1,26728
SJAG_02061 ATP-dependent RNA/DNA helicase	Supercontig_5.3:29	23,0224	9,5476	-1,26983
SJAG_03031 rab GTPase binding protein upregulated in meiosis II	Supercontig_5.2:29	8,64582	3,57717	-1,27318
SJAG_04481 spermidine synthase	Supercontig_5.3:78	368,362	152,213	-1,27503
SJAG_02685,SJAG_02686,SJAG_02687	Supercontig_5.1:12	142,308	58,6024	-1,27999
SJAG_04231 dolichol kinase	Supercontig_5.2:28	25,7387	10,5719	-1,2837
SJAG_03376,SJAG_03378 STE/STE20/YSK protein kinase Sid1	Supercontig_5.2:97	33,4474	13,697	-1,28803
SJAG_00682 cohesin loading factor Ssl3	Supercontig_5.1:28	25,8407	10,5713	-1,2895
SJAG_02673 DUF2009 protein	Supercontig_5.1:12	19,6504	8,0359	-1,29003
SJAG_00519 DUF962 family protein	Supercontig_5.1:31	20,2975	8,29897	-1,2903
SJAG_01083 karyopherin Kap113	Supercontig_5.1:20	31,4898	12,8659	-1,29133
SJAG_02161 glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Supercontig_5.1:13	64,0026	26,1414	-1,29179
SJAG_05241 DUF1690 family protein	Supercontig_5.3:20	69,7616	28,4841	-1,29227
SJAG_03999 meiotically upregulated Mug97	Supercontig_5.2:33	42,8761	17,4689	-1,29539
SJAG_01082 BUB protein kinase Bub1	Supercontig_5.1:20	23,2184	9,45807	-1,29565
SJAG_00933 atypical/ABC1/ABC1-A protein kinase Abc1	Supercontig_5.1:23	22,646	9,20717	-1,29842
SJAG_05693,SJAG_05694	Supercontig_5.3:18	46,4808	18,873	-1,30031
SJAG_02779,SJAG_02780 vitamin H transporter Vth1	Supercontig_5.1:14	239,682	97,2704	-1,30105
SJAG_03824 alpha-glucosidase//hypothetical protein érdekes lehet!	Supercontig_5.2:37	12,4904	5,04359	-1,30829
SJAG_03211 elongin C	Supercontig_5.2:64	35,4747	14,3183	-1,30894
SJAG_03621 DUF55 family protein	Supercontig_5.2:14	18,7694	7,57453	-1,30916
SJAG_03236 tRNA dihydrouridine synthase Dus2	Supercontig_5.2:69	30,9371	12,4817	-1,30953
SJAG_03669 UPF0031 family protein//hypothetical protein	Supercontig_5.2:15	127,234	51,3104	-1,31016
SJAG_04881 pig-A	Supercontig_5.2:22	23,2377	9,36992	-1,31036
SJAG_03282 meiotically upregulated Mug99	Supercontig_5.2:78	17,2014	6,91782	-1,31413
SJAG_03998 meiotically upregulated Mug57	Supercontig_5.2:33	47,9121	19,2626	-1,31459
SJAG_03377 phospholipase	Supercontig_5.2:97	23,3473	9,37381	-1,31655

SJAG_01790 protein phosphatase type 2A	Supercontig_5.3:23	14,8762	5,97027	-1,31713
SJAG_03775 imidazoleglycerol-phosphate synthase	Supercontig_5.2:38	53,2845	21,3426	-1,31998
SJAG_02066 SAGA complex subunit Spt8	Supercontig_5.3:29	27,9424	11,1832	-1,32112
SJAG_02201 ribosomal protein subunit L51-b	Supercontig_5.1:22	44,1655	17,6297	-1,32491
SJAG_04536 hypothetical protein	Supercontig_5.3:67	32,7324	13,0451	-1,32721
SJAG_03426 fungal protein	Supercontig_5.2:10	17,119	6,8214	-1,32746
SJAG_00639 splicing factor Prp17	Supercontig_5.1:29	26,1755	10,428	-1,32775
SJAG_01624 GINS complex subunit Sld5	Supercontig_5.3:20	46,6077	18,5532	-1,3289
SJAG_02475 ribosome biogenesis protein Rrp14-N	Supercontig_5.1:81	40,4653	16,0676	-1,33253
SJAG_05679 ribosome assembly protein	Supercontig_5.3:17	15,1336	5,99489	-1,33595
SJAG_02814,SJAG_02815	Supercontig_5.1:15	44,493	17,62	-1,33636
SJAG_03946 NADH kinase	Supercontig_5.2:34	19,0226	7,5309	-1,33682
SJAG_02443 LAlv9 family protein	Supercontig_5.1:75	37,1926	14,7232	-1,33692
SJAG_01049 DNA repair protein Rhp42	Supercontig_5.1:20	24,2167	9,58109	-1,33774
SJAG_02306 iron-sulfur cluster biogenesis protein	Supercontig_5.1:45	47,6983	18,8705	-1,3378
SJAG_02690 ATP-dependent 3' to 5' DNA helicase	Supercontig_5.1:12	11,6689	4,61228	-1,33912
SJAG_05025 hypothetical protein mindekiben 3 példány!	Supercontig_5.2:20	41,9517	16,5795	-1,33933
SJAG_04458 NAD binding dehydrogenase	Supercontig_5.3:83	2227,81	878,25	-1,34292
SJAG_05244 ribosomal protein subunit L37	Supercontig_5.3:21	30,9065	12,1665	-1,345
SJAG_01996,SJAG_01997	Supercontig_5.3:27	59,1655	23,2011	-1,35056
SJAG_00199 phospholipase	Supercontig_5.1:38	29,6533	11,6269	-1,35073
SJAG_04449,SJAG_04450	Supercontig_5.3:84	440,815	172,706	-1,35186
SJAG_00500 DNA repair protein RAD16	Supercontig_5.1:32	5,91899	2,31872	-1,35202
SJAG_02155 fluconazole resistance protein//MFS family membrane transporter	Supercontig_5.1:11	133,631	52,3301	-1,35254
SJAG_04530 Rad22 Rti1	Supercontig_5.3:68	3,494	1,36589	-1,35503
SJAG_00445 membrane transporter	Supercontig_5.1:33	21,9458	8,57512	-1,35571
SJAG_01593 ubiquitin-protein ligase E3	Supercontig_5.3:19	10,703	4,18194	-1,35577
SJAG_04072 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.2:31	515,938	201,535	-1,35617
SJAG_05358 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:42	23,5903	9,21446	-1,35622
SJAG_00668 superoxide dismutase Sod1	Supercontig_5.1:28	1880,91	733,702	-1,35817
SJAG_01000 CMGC/CDK protein kinase Csk1	Supercontig_5.1:22	24,0501	9,37471	-1,3592
SJAG_04610 ribosome biogenesis protein Nop6	Supercontig_5.3:51	27,3281	10,6017	-1,36609
SJAG_04275 retromer complex subunit Vps5	Supercontig_5.2:27	156,411	60,6287	-1,36727
SJAG_03584 ribosomal protein subunit S2	Supercontig_5.2:13	21,8664	8,47363	-1,36766
SJAG_04257 non-specific DNA binding protein Spt2	Supercontig_5.2:27	26,1386	10,1075	-1,37076
SJAG_04211 19S proteasome regulatory subunit	Supercontig_5.2:28	82,5512	31,8746	-1,37288
SJAG_02618 glutamine-dependent NAD synthetase	Supercontig_5.1:11	29,0241	11,1921	-1,37478
SJAG_03601,SJAG_03602 CAMK/CAMKL protein kinase Cdr2	Supercontig_5.2:14	47,8099	18,4114	-1,37671
SJAG_04791 sister chromatid cohesion protein/DNA polymerase eta Eso1	Supercontig_5.3:12	14,9666	5,7584	-1,37801
SJAG_02946 amino acid permease// general amino acid permease GAP1	Supercontig_5.2:96	13,2479	5,09554	-1,37846
SJAG_00036 hydantoin racemase family protein	Supercontig_5.1:41	35,901	13,8021	-1,37913
SJAG_05194 vacuolar sorting protein Vps33	Supercontig_5.1:31	9,00842	3,46092	-1,38012
SJAG_00628 ribosomal protein subunit S5	Supercontig_5.1:29	22,7643	8,74171	-1,38078

SJAG_04232 ULK/ULK protein kinase Atg1	Supercontig_5.2:28	44,5655	17,1	-1,38193
SJAG_04310 THO complex subunit	Supercontig_5.2:26	138,019	52,8706	-1,38433
SJAG_02434 hypothetical protein	Supercontig_5.1:73	18,424	7,05284	-1,38531
SJAG_00372 plasma membrane proteolipid Pmp3	Supercontig_5.1:34	1865,52	713,785	-1,38602
SJAG_03585,SJAG_03586 vacuolar carboxypeptidase	Supercontig_5.2:13	50,4028	19,263	-1,38767
SJAG_03674 ATPase expression protein	Supercontig_5.2:16	13,5003	5,15833	-1,38802
SJAG_03214 RNA-binding protein Prp24	Supercontig_5.2:64	14,2159	5,43149	-1,38809
SJAG_00349 Clr6 histone deacetylase complex subunit Alp13	Supercontig_5.1:35	39,8544	15,2157	-1,38918
SJAG_02262 hypothetical protein// RecQ mediated genome instability protein	Supercontig_5.1:35	14,6775	5,59597	-1,39115
SJAG_04079 U2-associated protein	Supercontig_5.2:31	24,1044	9,18664	-1,39169
SJAG_00758 transcription factor TFIIH complex subunit Ssl1	Supercontig_5.1:27	25,3625	9,66035	-1,39255
SJAG_04637 general amino acid permease GAP1	Supercontig_5.3:45	25,3665	9,65308	-1,39386
SJAG_05206 tel Two Interacting protein 2	Supercontig_5.1:25	12,2855	4,66783	-1,39613
SJAG_00754 tRNA-splicing endonuclease subunit Sen54	Supercontig_5.1:27	60,9718	23,1353	-1,39805
SJAG_02151,SJAG_02152	Supercontig_5.1:10	1347,39	509,717	-1,40239
SJAG_00657 rRNA processing protein Mis3	Supercontig_5.1:29	232,343	87,8733	-1,40276
SJAG_02065 TPR repeat protein Oca3/ER membrane protein complex Ecm2	Supercontig_5.3:29	15,1272	5,71912	-1,40328
SJAG_00576 intermembrane space protein sorting protein	Supercontig_5.1:30	76,2974	28,8292	-1,4041
SJAG_01228 kinetochore protein Mis14	Supercontig_5.3:12	10,2957	3,88991	-1,40423
SJAG_00140 hypothetical protein//p150-Glued	Supercontig_5.1:39	20,2472	7,6473	-1,4047
SJAG_00854 exosomal 3'-5' exoribonuclease	Supercontig_5.1:25	82,0103	30,9304	-1,40678
SJAG_00233 SPX/EXS domain-containing protein	Supercontig_5.1:37	11,4296	4,30447	-1,40887
SJAG_04026 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:32	78,5119	29,5677	-1,40889
SJAG_01172,SJAG_01173	Supercontig_5.3:11	27,6538	10,3993	-1,41099
SJAG_04368 transcription factor TFIIH complex subunit Tfb4	Supercontig_5.2:25	12,7202	4,78193	-1,41146
SJAG_01205 DNA repair protein RAD9	Supercontig_5.3:11	16,5721	6,20666	-1,41687
SJAG_03838,SJAG_03839	Supercontig_5.2:36	70,4955	26,4018	-1,41689
SJAG_00634,SJAG_00636	Supercontig_5.1:29	492,947	184,545	-1,41746
SJAG_02601 elongation factor 1 alpha like protein	Supercontig_5.1:10	38,0243	14,2066	-1,42035
SJAG_01284 hypothetical protein// ZNF277 ortholog	Supercontig_5.3:13	13,0686	4,88115	-1,42082
SJAG_03504 Pof6 interacting protein Sip1	Supercontig_5.2:12	12,9254	4,8209	-1,42283
SJAG_03618 transcription factor TFIIH complex subunit Pmh1	Supercontig_5.2:14	13,5398	5,01198	-1,43375
SJAG_00860 ribosomal protein subunit S10	Supercontig_5.1:25	19,3088	7,14669	-1,43391
SJAG_01546 kinesin-like protein Pkl1	Supercontig_5.3:18	28,1016	10,3886	-1,43565
SJAG_03213 carbohydrate kinase	Supercontig_5.2:64	18,2977	6,7613	-1,43629
SJAG_03932 cytosolic thiouridylase subunit Ctu1	Supercontig_5.2:34	122,825	45,3538	-1,43731
SJAG_03284 ribosomal protein subunit L1	Supercontig_5.2:79	26,5696	9,8079	-1,43776
SJAG_02441 meiotically upregulated Mug66	Supercontig_5.1:74	291,009	107,068	-1,44254
SJAG_02955 general amino acid permease AGP2	Supercontig_5.2:12	6,16933	2,25789	-1,45014
SJAG_01633 hypothetical protein	Supercontig_5.3:20	22,6437	8,26409	-1,45418
SJAG_01119 N-glycosylase/DNA lyase	Supercontig_5.3:10	35,0187	12,7445	-1,45825
SJAG_01623 RNase P and RNase MRP subunit	Supercontig_5.3:20	27,5674	10,0247	-1,45941
SJAG_01626 calreticulin/calnexin	Supercontig_5.3:20	26,5927	9,65484	-1,4617

SJAG_02970 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:16	144,827	52,5346	-1,46299
SJAG_02068 triglyceride lipase-cholesterol esterase	Supercontig_5.3:29	44,9424	16,258	-1,46693
SJAG_05729 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:21	101,447	36,6691	-1,46809
SJAG_04359,SJAG_04360	Supercontig_5.2:25	71,9088	25,9591	-1,46993
SJAG_04922,SJAG_04923 sporulation protein spo3	Supercontig_5.2:22	39,8136	14,352	-1,47201
SJAG_03461 translation elongation factor EF- Tu Tuf1	Supercontig_5.2:11	61,418	22,1037	-1,47437
SJAG_00976 cytochrome c oxidase subunit IV	Supercontig_5.1:22	156,059	55,9077	-1,48097
SJAG_00558 phosducin family protein	Supercontig_5.1:31	60,0752	21,5073	-1,48194
SJAG_05558 fungal protein	Supercontig_5.1:21	333,862	119,227	-1,48555
SJAG_01995 oxoprolinase	Supercontig_5.3:27	23,4684	8,36705	-1,48793
SJAG_02975 hypoxia induced family protein	Supercontig_5.2:17	46,7375	16,5711	-1,49591
SJAG_05637 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:13	49,3047	17,469	-1,49692
SJAG_03822 alcohol dehydrogenase Adh4	Supercontig_5.2:37	48,7629	17,1774	-1,50527
SJAG_02769 acetyl-CoA hydrolase	Supercontig_5.1:14	62,4435	21,9863	-1,50595
SJAG_01638 tRNA acetyltransferase	Supercontig_5.3:20	40,4474	14,2132	-1,50881
SJAG_02951 gal10, UDP-glucose 4-epimerase/aldose 1-epimerase	Supercontig_5.2:11	564,12	197,948	-1,51088
SJAG_05746 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:23	99,2179	34,7143	-1,51507
SJAG_01650 RNA-binding protein Rnp24	Supercontig_5.3:20	150,452	52,3167	-1,52396
SJAG_03288 N-acetyltransferase Ats1//hypothetical protein	Supercontig_5.2:79	36,03	12,5017	-1,52708
SJAG_06355 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.2:28	19,2573	6,68186	-1,52708
SJAG_05175 pantothenate transporter	Supercontig_5.1:41	17,6212	6,08809	-1,53325
SJAG_02777 ribosomal protein subunit S18	Supercontig_5.1:14	35,2549	12,1758	-1,53381
SJAG_00327 DNA replication pre-initiation complex subunit Cdc45	Supercontig_5.1:35	12,987	4,48221	-1,53478
SJAG_03685 telomere maintenance protein Ccq1	Supercontig_5.2:16	19,1612	6,60178	-1,53726
SJAG_03412 fungal protein	Supercontig_5.2:10	8,53628	2,93231	-1,54157
SJAG_00889 ribosomal protein subunit S4	Supercontig_5.1:24	14,801	5,07059	-1,54546
SJAG_03131,SJAG_03132	Supercontig_5.2:48	97,4643	33,2667	-1,5508
SJAG_01184 UPF0171 family protein//hypothetical	Supercontig_5.3:11	19,2757	6,57267	-1,55223
SJAG_00672,SJAG_00673	Supercontig_5.1:28	61,3892	20,9161	-1,55337
SJAG_03293 succinate-semialdehyde dehydrogenase	Supercontig_5.2:79	257,046	87,3413	-1,55729
SJAG_00310 mannan endo-1,6-alpha-mannosidase DCW1	Supercontig_5.1:36	208,657	70,4601	-1,56625
SJAG_03936 Sid2-Mob1 kinase complex regulatory subunit Mob1	Supercontig_5.2:34	113,698	38,175	-1,5745
SJAG_00162,SJAG_00163 hypothetical protein s pombe 2 példány	Supercontig_5.1:39	62,2667	20,9044	-1,57465
SJAG_04787 PQ loop protein	Supercontig_5.3:13	24,3319	8,1657	-1,5752
SJAG_04614 TFIIF complex cyclin Mcs2	Supercontig_5.3:50	40,7971	13,6018	-1,58467
SJAG_00624 lanosterol synthase Erg7	Supercontig_5.1:29	197,92	65,9854	-1,5847
SJAG_01422 nuclear envelope protein Brr6/Brl1	Supercontig_5.3:15	36,0111	11,9929	-1,58627
SJAG_02397 peptidase complex beta subunit Qcr1	Supercontig_5.1:65	115,108	38,138	-1,59369
SJAG_03620 TLDc domain-containing protein 2	Supercontig_5.2:14	26,7951	8,86688	-1,59547
SJAG_03434 4-aminobutyrate aminotransferase	Supercontig_5.2:10	246,869	81,6758	-1,59576
SJAG_01084 CAMK/CAMK1 protein kinase Srk1	Supercontig_5.1:20	320,884	106,073	-1,597
SJAG_00788 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:26	1828,97	604,417	-1,59742
SJAG_04939 bis(5'-adenosyl)-triphosphatase	Supercontig_5.2:21	13,2509	4,37283	-1,59945

SJAG_05346 tuberin	Supercontig_5.2:22	16,4174	5,41361	-1,60057
SJAG_03764 dolichyl-phosphate-glucose-glycolipid alpha- glucosyltransferase	Supercontig_5.2:18	27,3802	9,01635	-1,60251
SJAG_02724 replication fork protection complex subunit Swi1	Supercontig_5.1:13	25,1423	8,25444	-1,60687
SJAG_00547 inorganic phosphate transporter	Supercontig_5.1:31	118,257	38,8064	-1,60756
SJAG_03489,SJAG_03490	Supercontig_5.2:11	56,1612	18,2638	-1,61271
SJAG_01040 CMGC/DYRK/PRP4 protein kinase Prp4	Supercontig_5.1:21	26,9338	8,79681	-1,61436
SJAG_00815 predicted: dihydropteroatesynthase/2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridinediphosphokinase/dihydroneopterinaldolase	Supercontig_5.1:2 614245-2616390	10,3167	3,33418	-1,62957
SJAG_05249 tRNA(Ile)-lysine synthetase	Supercontig_5.3:25	13,6017	4,38624	-1,63273
SJAG_04025 mago-nashi	Supercontig_5.2:32	33,7414	10,8717	-1,63395
SJAG_04658 methyltransferase	Supercontig_5.3:41	160,671	51,6617	-1,63694
SJAG_02770,SJAG_02772	Supercontig_5.1:14	152,426	48,9836	-1,63783
SJAG_04843 fumarate hydratase	Supercontig_5.2:23	217,542	69,7847	-1,64032
SJAG_01988 RNA-binding protein	Supercontig_5.3:27	93,348	29,8794	-1,64347
SJAG_01085 fungal protein	Supercontig_5.1:20	87,5383	28,0055	-1,64421
SJAG_01505 acetate transporter	Supercontig_5.3:17	11,3783	3,63465	-1,6464
SJAG_00489 DUF953 family protein	Supercontig_5.1:32	450,982	143,466	-1,65236
SJAG_01763 ubiquinol-cytochrome-c reductase complex subunit 9	Supercontig_5.3:23	62,0076	19,7171	-1,653
SJAG_05328 TRE Xcomplex subunit Tex1	Supercontig_5.2:27	14,5777	4,56975	-1,67358
SJAG_04989 Ino80 complex subunit Ies2	Supercontig_5.2:20	51,0693	15,9649	-1,67755
SJAG_00985 F0-ATPase subunit G	Supercontig_5.1:22	59,7169	18,5581	-1,68609
SJAG_03927 origin recognition complex subunit Orc1	Supercontig_5.2:34	20,4336	6,33378	-1,68981
SJAG_05199 inner membrane protein	Supercontig_5.1:27	121,281	37,4994	-1,69342
SJAG_04647 mediator complex subunit Med31	Supercontig_5.3:42	20,206	6,22603	-1,6984
SJAG_02200 RecQ type DNA helicase Hrq1	Supercontig_5.1:22	6,42772	1,96283	-1,71137
SJAG_02778 chromatin silencing protein Clr2	Supercontig_5.1:14	30,7081	9,34063	-1,71703
SJAG_03645 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:15	12,6235	3,83952	-1,71712
SJAG_02148 glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Supercontig_5.1:10	63,4226	19,2472	-1,72035
SJAG_04061 argonaute binding protein 2	Supercontig_5.2:31	20,2766	6,12683	-1,7266
SJAG_02428 valine-tRNA ligase Vrs2/Vas2	Supercontig_5.1:71	23,2898	7,01827	-1,73051
SJAG_01965 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:27	47,0589	13,9959	-1,74946
SJAG_02698 helicase SWR1	Supercontig_5.1:12	16,3507	4,86031	-1,75023
SJAG_04258 P-type proton ATPase Pma2	Supercontig_5.2:27	33,9681	10,0293	-1,75997
SJAG_03419,SJAG_03420	Supercontig_5.2:10	552,447	162,979	-1,76115
SJAG_01889 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.3:25	8,71376	2,56566	-1,76397
SJAG_03508,SJAG_03509	Supercontig_5.2:12	380,558	111,763	-1,76768
SJAG_04578 nuclear membrane organization protein Apq12	Supercontig_5.3:58	58,1876	17,0767	-1,76868
SJAG_00273 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:36	1596,82	468,52	-1,76902
SJAG_04182 metallopeptidase Pgp2	Supercontig_5.2:29	41,9687	12,2883	-1,77203
SJAG_00935 hypothetical protein	Supercontig_5.1:23	13,9402	4,08111	-1,77222
SJAG_00462 fungal protein	Supercontig_5.1:32	50,726	14,746	-1,7824
SJAG_03964 exopolyphosphatase	Supercontig_5.2:33	24,3821	7,08711	-1,78255
SJAG_01625 m7G(5')pppN diphosphatase	Supercontig_5.3:20	19,943	5,78353	-1,78586

SJAG_05339,SJAG_05340	Supercontig_5.3:14	37,0387	10,6596	-1,70688
SJAG_03238 cyclophilin family peptidyl-prolyl cis- trans isomerase Cyp3	Supercontig_5.2:69	41,37	11,7683	-1,81368
SJAG_00165 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.1:39	413,515	116,798	-1,82393
SJAG_02790 DNA repair endonuclease	Supercontig_5.1:14	7,39141	2,08374	-1,82668
SJAG_01214 complexed with Cdc5 protein Cwf12	Supercontig_5.3:11	46,9709	13,2035	-1,83084
SJAG_05232 DNA replication protein Cdc24	Supercontig_5.3:15	11,3543	3,17842	-1,83686
SJAG_04042 FAD binding protein	Supercontig_5.2:32	11,457	3,20696	-1,83696
SJAG_05005 fungal protein	Supercontig_5.2:20	213,576	59,1395	-1,85256
SJAG_01579 chromodomain protein 2	Supercontig_5.3:19	34,4879	9,44914	-1,86784
SJAG_03710 Mdm10/Mdm12/Mmm1 complex subunit Mdm12	Supercontig_5.2:16	25,9619	7,06883	-1,87685
SJAG_02194 telomere end-binding protein Pot1	Supercontig_5.1:20	8,78784	2,39115	-1,8778
SJAG_06110 ribosomal protein subunit l44	Supercontig_5.2:65	71,007	19,3195	-1,87791
SJAG_03418 mitotic cohesin complex	Supercontig_5.2:10	17,7799	4,81471	-1,88473
SJAG_02886 gamma tubulin complex subunit Mod21	Supercontig_5.1:16	13,365	3,60678	-1,88968
SJAG_03303 manganese superoxide dismutase	Supercontig_5.2:82	1061,43	284,836	-1,8978
SJAG_02446 glucosidase	Supercontig_5.1:75	14,8056	3,96905	-1,89928
SJAG_02545 Smc5-6 complex SMC subunit Smc6	Supercontig_5.1:94	5,9968	1,58933	-1,91577
SJAG_02338 non classical export pathway protein	Supercontig_5.1:52	569,256	150,791	-1,91653
SJAG_01607 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.3:19	110,533	29,2788	-1,91655
SJAG_04409 lysine-tRNA ligase	Supercontig_5.2:24	11,0013	2,90267	-1,92222
SJAG_03873,SJAG_03874	Supercontig_5.2:35	45,3225	11,949	-1,92334
SJAG_01332 Smc5-6 complex non-SMC subunit Nse4	Supercontig_5.3:14	30,7552	8,03099	-1,93718
SJAG_04179 NatA N-acetyltransferase complex subunit	Supercontig_5.2:29	20,4182	5,31312	-1,94222
SJAG_03835 gamma tubulin complex Spc97/GCP2 subunit Alp4	Supercontig_5.2:36	18,8102	4,88862	-1,94402
SJAG_01221 ATP-dependent DNA helicase	Supercontig_5.3:11	22,4093	5,78052	-1,95483
SJAG_03198 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase Oar2	Supercontig_5.2:61	35,9208	9,22247	-1,96159
SJAG_03287 bouquet formation protein Bqt2	Supercontig_5.2:79	7,97265	2,04254	-1,96469
SJAG_02198 CAF assembly factor complex subunit B	Supercontig_5.1:21	20,9555	5,35718	-1,96778
SJAG_01472 WD repeat protein	Supercontig_5.3:17	56,0615	14,2899	-1,97202
SJAG_02302 GTPase	Supercontig_5.1:45	17,4149	4,43395	-1,97365
SJAG_02150 amino acid permease inda1	Supercontig_5.1:10	27,551	7,00226	-1,97621
SJAG_01761 meiotically upregulated Mug174	Supercontig_5.3:23	46,5788	11,8383	-1,97621
SJAG_01634 U4/U6 X U5 tri-snRNP complex subunit Prp3	Supercontig_5.3:20	34,1603	8,66476	-1,97909
SJAG_03901 RNA methyltransferase Tgs1	Supercontig_5.2:35	64,4138	16,2446	-1,98741
SJAG_04906 mannosyltransferase	Supercontig_5.2:22	34,0592	8,58844	-1,98758
SJAG_00837 hypothetical protein Sj spesifikus	Supercontig_5.1:25	9,72575	2,44526	-1,99182
SJAG_04380 tRNA specific adenosine deaminase	Supercontig_5.2:25	15,3006	3,84661	-1,99193
SJAG_01461 argininosuccinate lyase	Supercontig_5.3:16	121,752	30,5785	-1,99335
SJAG_00511 nuclear distribution protein nudF	Supercontig_5.1:32	13,0478	3,27268	-1,99526
SJAG_04085 diphthamide biosynthesis protein	Supercontig_5.2:31	101,625	25,3973	-2,0005
SJAG_02342,SJAG_02343; cytochrome b2; hypothetical protein pombohan ni	Supercontig_5.1:87	819,269	204,146	-2,00474
SJAG_01110 hypothetical protein	Supercontig_5.31:9	22,9327	5,68822	-2,01136
SJAG_02958 hexose transporter Ght5	Supercontig_5.2:13	322,891	79,7131	-2,01816

SJAG_04674 hypothetical protein Sj spezifikus	Supercontig_5.3:37	110,545	27,0414	-2,03139
SJAG_03046 SURF-family protein	Supercontig_5.2:31	36,7035	8,97455	-2,03201
SJAG_04376 peptidase	Supercontig_5.2:25	980,872	238,666	-2,03907
SJAG_01903 proline dehydrogenase	Supercontig_5.3:25	6,14558	1,49073	-2,04353
SJAG_01283 Atg8 deconjugator Atg4	Supercontig_5.3:13	44,5572	10,7725	-2,04831
SJAG_00046 hypothetical protein Sj spezifikus	Supercontig_5.1:41	26,2412	6,34324	-2,04854
SJAG_05889 hypothetical protein Sj spezifikus	Supercontig_5.1:36	1269,65	306,073	-2,05249
SJAG_03325 COP9/signalosome complex subunit Csn2	Supercontig_5.2:87	11,6451	2,80562	-2,05333
SJAG_05224 hypothetical protein//c19orf29 ortholog	Supercontig_5.3:13	13,0499	3,13398	-2,05797
SJAG_04183 DNA replication endonuclease-helicase Dna2	Supercontig_5.2:29	10,9065	2,6032	-2,06683
SJAG_04715 membrane transporter	Supercontig_5.3:28	14,6916	3,50552	-2,06729
SJAG_00625 hypothetical protein Sj spezifikus	Supercontig_5.1:29	4943,07	1178,15	-2,06888
SJAG_00611 DNA polymerase zeta Rev7	Supercontig_5.1:30	38,1	9,07305	-2,07013
SJAG_03338 rho-type GTPase activating protein	Supercontig_5.2:88	8,43448	1,9944	-2,08034
SJAG_04273 meiotically upregulated Mug123	Supercontig_5.2:27	15,4917	3,65129	-2,08502
SJAG_04435 IRE protein kinase Ire1	Supercontig_5.2:23	13,3969	3,11467	-2,10474
SJAG_00898,SJAG_00899; hypothetical protein/MCM-associated protein Mc	Supercontig_5.1:34	2636,72	609,907	-2,11208
SJAG_01893 hypothetical protein Sj spezifikus	Supercontig_5.3:25	16,2877	3,75071	-2,11855
SJAG_01622 RSC complex subunit Rsc9	Supercontig_5.3:20	8,9648	2,06135	-2,12068
SJAG_00309 acireductone dioxygenase family protein	Supercontig_5.1:36	215,295	49,1066	-2,13232
SJAG_00111 ATP-dependent DNA helicase	Supercontig_5.1:40	38,0618	8,628	-2,14124
SJAG_05338 urease accessory protein UreF	Supercontig_5.3:17	43,3425	9,79691	-2,14539
SJAG_00217 eukaryotic protein	Supercontig_5.1:38	35,0893	7,91845	-2,14774
SJAG_03825 UbiE family methyltransferase	Supercontig_5.2:37	26,2046	5,90823	-2,14902
SJAG_02341 ubiquitin carboxy terminal hydrolase Uch2	Supercontig_5.1:53	38,4694	8,55355	-2,16912
SJAG_00113 hypothetical protein	Supercontig_5.1:40	16,6633	3,66896	-2,18323
SJAG_00238 glutathione S-transferase Gst1	Supercontig_5.1:37	9,68679	2,12691	-2,18726
SJAG_02022 hypothetical protein	Supercontig_5.3:29	16,2564	3,54327	-2,19786
SJAG_02199 DNA replication ATPase	Supercontig_5.1:22	11,2969	2,41706	-2,2246
SJAG_02615 phenylalanyl-tRNA synthetase	Supercontig_5.1:11	13,6912	2,92909	-2,22472
SJAG_05201 hypothetical protein Sj spezifikus	Supercontig_5.1:25	1,75889	0,37352	-2,2354
SJAG_02696 glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Supercontig_5.1:12	984,561	208,696	-2,23808
SJAG_03790 alpha-1,2-galactosyltransferase gmh3	Supercontig_5.2:37	17,7668	3,71863	-2,25634
SJAG_05345 hypothetical protein Sj spezifikus	Supercontig_5.2:23	15,977	3,34358	-2,25653
SJAG_01575 tRNA isopentenyltransferase	Supercontig_5.3:19	8,8009	1,80831	-2,28301
SJAG_02436 ribosome biogenesis protein Sgt1	Supercontig_5.1:73	124,232	25,3878	-2,29083
SJAG_03432 WDR44 family WD repeat protein	Supercontig_5.2:10	19,5782	3,99326	-2,29361
SJAG_02091 phospholipase B Plb1	Supercontig_5.3:29	148,954	30,3263	-2,29623
SJAG_00960 fungal protein	Supercontig_5.1:22	469,893	95,6523	-2,29646
SJAG_03498 RNA-binding protein	Supercontig_5.2:12	44,9656	9,0115	-2,31898
SJAG_00102 N-myristoyltransferase 1	Supercontig_5.1:40	14,6382	2,92191	-2,32476
SJAG_00112 Tel2/Rad-5/Clk-2 family protein Tel2	Supercontig_5.1:40	16,9741	3,38245	-2,3272
SJAG_03525 G2/mitotic-specific cyclin c1a1	Supercontig_5.2:12	14,534	2,89492	-2,32783

SJAG_02883 potassium ion transporter Trk2	Supercontig_5.1:16	4,91709	0,96942	-2,34261
SJAG_01371 DASH complex subunit Dad2	Supercontig_5.3:14	26,162	5,15292	-2,34401
SJAG_03323 SMN family protein yip11	Supercontig_5.2:86	28,9884	5,70199	-2,34594
SJAG_01492 NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase ydfG	Supercontig_5.3:17	11,0338	2,15591	-2,35556
SJAG_05329 anaphase-promoting complex subunit Apc1	Supercontig_5.2:26	56,6698	10,9702	-2,36899
SJAG_02617 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.1:11	15,2541	2,92693	-2,38174
SJAG_04298 hydantoin racemase family protein	Supercontig_5.2:26	71,5083	13,6766	-2,3864
SJAG_03649 ribosomal protein subunit Yml6	Supercontig_5.2:15	13,8616	2,65018	-2,38693
SJAG_00809 DNA replication protein Dre4	Supercontig_5.1:26	3,92147	0,74677	-2,39267
SJAG_00699 tspO/peripheral benzodiazepine receptor	Supercontig_5.1:28	639,034	118,912	-2,426
SJAG_00675 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:28	4,85679	0,89981	-2,43232
SJAG_05265 Jmj1 protein	Supercontig_5.1:74	318,527	58,643	-2,44138
SJAG_00470 RRM-containing cyclophilin regulating transcription Rct1	Supercontig_5.1:32	99,6692	18,142	-2,45782
SJAG_03318 N-acetyltransferase	Supercontig_5.2:85	61,3971	11,1308	-2,46362
SJAG_06111 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:66	2,01401	0,36173	-2,47707
SJAG_03215 NatC N-acetyltransferase complex subunit Mak10	Supercontig_5.2:64	12,7086	2,26693	-2,48699
SJAG_04344 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:25	921,967	163,648	-2,49412
SJAG_02139 allantate permease//membrane transporter	Supercontig_5.1:82	237,236	41,5957	-2,51182
SJAG_16460 hypothetical protein	Supercontig_5.31:9	21,6694	3,59919	-2,58991
SJAG_02729 oxidoreductase	Supercontig_5.1:13	142,208	23,1477	-2,61906
SJAG_03836,SJAG_03837	Supercontig_5.2:36	327,811	53,1147	-2,62568
SJAG_03016 fungal protein	Supercontig_5.2:26	17,9179	2,89889	-2,62783
SJAG_06681 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:21	128,274	20,6717	-2,6335
SJAG_03324 ubiquitin-protein ligase E3	Supercontig_5.2:87	22,9659	3,59994	-2,67344
SJAG_01578 fungal protein	Supercontig_5.3:19	35,9086	5,546	-2,69481
SJAG_04074 tubulin specific chaperone cofactor D	Supercontig_5.2:31	8,8817	1,34703	-2,72105
SJAG_00277 c15orf24 ortholog//hypothetical protein	Supercontig_5.1:36	82,1612	12,3944	-2,72877
SJAG_02949 alpha-galactosidase	Supercontig_5.2:10	54,3086	8,17455	-2,73197
SJAG_00493 fumarylacetoacetate hydrolase	Supercontig_5.1:32	114,5	17,1062	-2,74276
SJAG_01589 tricarboxylate transporter	Supercontig_5.3:19	20,9344	3,12452	-2,74417
SJAG_01147 eukaryotic protein	Supercontig_5.3:10	11,723	1,723	-2,76634
SJAG_02238 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.1:30	6,74674	0,98761	-2,77218
SJAG_00645 ubiquitin-like conjugating enzyme Atg7	Supercontig_5.1:29	10,8176	1,57891	-2,77638
SJAG_02293 5'-methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	Supercontig_5.1:42	28,718	4,15417	-2,78932
SJAG_04828 membrane transporter	Supercontig_5.3:56	73,2921	10,5968	-2,79003
SJAG_00307 centromere-specific histone H3 CENP-A	Supercontig_5.1:36	103,525	14,9138	-2,79526
SJAG_04686 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:46	1,84716	0,26164	-2,81968
SJAG_02708 RecA family ATPase Rhp55	Supercontig_5.1:12	323,815	45,7673	-2,82278
SJAG_03251,SJAG_03253	Supercontig_5.2:71	1786,78	247,162	-2,85383
SJAG_00799 ribosomal protein subunit L23	Supercontig_5.1:26	17,7641	2,42617	-2,87221
SJAG_04751 ELLA family acetyltransferase	Supercontig_5.3:20	38,1718	5,18742	-2,87942
SJAG_03079 membrane transporter	Supercontig_5.2:39	103,486	13,9104	-2,8952
SJAG_02445 hypothetical protein	Supercontig_5.1:75	12,7171	1,64741	-2,9485

SJAG_00674 succinate-semialdehyde dehydrogenase	Supercontig_5.1:28	25,3996	3,28171	-2,95228
SJAG_02677 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.1:12	4,52132	0,56226	-3,00743
SJAG_00308 peptide release factor	Supercontig_5.1:36	208,116	25,8161	-3,01104
SJAG_00223 hsp9-like protein	Supercontig_5.1:37	5505,74	680,437	-3,0164
SJAG_05315 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:34	10,81	1,32892	-3,02404
SJAG_01968 pepsin A	Supercontig_5.3:27	181,491	21,9176	-3,04973
SJAG_02707 protein kinase inhibitor	Supercontig_5.1:12	1193,85	128,28	-3,21825
SJAG_01525 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:18	69,6453	7,42773	-3,22903
SJAG_05398 inner membrane protein	Supercontig_5.1:38	12,3411	1,25735	-3,29501
SJAG_02960 flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase family protein	Supercontig_5.2:14	166,358	16,4731	-3,3361
SJAG_02442 hypothetical protein	Supercontig_5.1:74	5368,39	517,563	-3,37468
SJAG_06471 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:36	420,088	37,8937	-3,47066
SJAG_04299 uricase	Supercontig_5.2:26	24,6108	2,2136	-3,47483
SJAG_04297 sulfonate dioxygenase	Supercontig_5.2:26	15,258	1,36643	-3,48109
SJAG_05182 allantoate permease	Supercontig_5.1:38	48,9197	4,12272	-3,56874
SJAG_05745 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.3:22	67,5084	5,62525	-3,58508
SJAG_06204 hypothetical protein Sj specifikus	Supercontig_5.2:14	1,24264	0,09359	-3,73096
SJAG_04430 hypothetical protein//sequence orphan	Supercontig_5.2:24	408,917	26,6936	-3,93724
SJAG_03526 Lsd90 protein	Supercontig_5.2:12	405,881	21,7211	-4,22389
SJAG_00781 P-factor pheromone Map2	Supercontig_5.1:26	39,1429	1,99285	-4,29585
SJAG_00469 siderophore-iron biosynthesis protein	Supercontig_5.1:32	93,0934	4,32551	-4,42774
SJAG_03606 hexose transporter Ght6	Supercontig_5.2:14	533,917	16,606	-5,00684
SJAG_02961 NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	Supercontig_5.2:14	220,022	2,878	-6,25643

Fügelék 2. táblázat: a *pka1* mutáns törzs RNS szekvenálási adatai

gene	value_1	value_2	log2(fold_change)
SJAG_02133 aminoacid permease	0	1,0132	
SJAG_06576 hypothetical protein	0,17783	2,2703	-3,674296091
SJAG_04575 meiotic chromosome segregation protein Meu6	1,4768	11,8061	-2,998986104
SJAG_04312 AGC/PKA protein kinase Pka1	27,7707	218,011	-2,972765482
SJAG_02947 general amino acid permease GAP1	10,7904	65,0844	-2,592563441
SJAG_03508 eukaryotic protein implicated in cell cycle regulation	42,2909	232,748	-2,460349603
SJAG_02126 trichothecene 3-O-acetyltransferase	1,15169	6,16883	-2,42124445
SJAG_00703 hypothetical protein//DUF1674 family protein	18,2604	97,2508	-2,41299175
SJAG_01739 hypothetical protein	50,8422	255,296	-2,32807257
SJAG_03724 DNA endonuclease III	4,76509	23,2295	-2,285382733
SJAG_06600 hypothetical protein	15,821	75,4696	-2,254054836
SJAG_05745 hypothetical protein	23,1974	108,908	-2,231074913
SJAG_00250 asteroid	3,10752	14,3469	-2,206903459
SJAG_01843 hypothetical protein	11,7234	52,7077	-2,1686227
SJAG_00168 CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate3-phosphatidyltransferase	20,8615	89,729	-2,104731438
SJAG_00020 trichothecene 3-O-acetyltransferase	23,6001	96,1784	-2,026919953
SJAG_02946 amino acid permease Gap1	2,27438	9,24039	-2,022480426
SJAG_00354 hypothetical protein	5,63707	22,88	-2,021069664
SJAG_02970 hypothetical protein	169,635	680,537	-2,004239736
SJAG_02649 beta-glucosidase Psu2	132,902	516,468	-1,958316148
SJAG_01418 diphthamide biosynthesis protein Dph3	768,728	2975,32	-1,952499718
SJAG_04240 hypothetical protein	6,06279	22,6011	-1,898339234
SJAG_01690 NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase ydfG	29,8284	110,62	-1,890853749
SJAG_05250 hypothetical protein	1,43851	5,32869	-1,889205656
SJAG_05002 fungal protein	33,7119	124,213	-1,881486327
SJAG_02652 linear element associated protein Hop1	2,56849	9,4443	-1,878523413
SJAG_01421 hypothetical protein//sequence orphan	7,28796	25,6766	-1,816867233
SJAG_05312 hypothetical protein	27,1249	94,8416	-1,805902183
SJAG_03189 CUE domain-containing protein Cue3	41,6909	145,066	-1,798905004
SJAG_00691 glutamine aminotransferase subunit	318,563	1060,96	-1,735719648
SJAG_01450 hypothetical protein	28,3309	90,4712	-1,675082174
SJAG_02124 cobW	0,51332	1,63898	-1,674865062
SJAG_02125 urea transporter	4,7501	15,1331	-1,671677762
SJAG_03438 CAMK/RAD53 protein kinase Mek1	2,23209	6,96237	-1,641183286
SJAG_00394 dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase Alg5	5,84533	18,0452	-1,626258753
SJAG_00685 phosphoglycerate mutase family protein	52,8834	162,682	-1,621167793
SJAG_02521 ubiquitin-protein ligase E3	11,4044	35,0269	-1,618872764
SJAG_00308 peptide release factor	223,714	686,8	-1,618234496
SJAG_04995 DNA replication checkpoint protein Drc1	1,39277	4,23886	-1,605719285
SJAG_00923 CobW/HypB/UreG nucleotide binding domain-containing protein	83,2558	252,901	-1,602950056
SJAG_04194 hypothetical protein	11,9667	36,3256	-1,601961265
SJAG_03906 deoxycytidyl transferase Rev1	12,7504	38,3475	-1,588590019
SJAG_00140 p150-Glued//hypothetical protein	12,7402	38,2673	-1,586724188
SJAG_00018 hypothetical protein	0,99683	2,98304	-1,581361036
SJAG_05729 hvpothetical protein	22,2577	66,5596	-1,580342244

SJAG_04696 kinetochore protein Mis15	9,79103	29,2568	-1,579239439
SJAG_02940 trichothecene 3-O-acetyltransferase	0,48429	1,44394	-1,576061719
SJAG_00708 hypothetical protein	0,56594	1,66958	-1,560771857
SJAG_01380 RNA-binding protein	2,24677	6,6196	-1,558891598
SJAG_02944 hypothetical protein	1,36939	4,01584	-1,552168408
SJAG_04636 hypothetical protein	0,5875	1,70454	-1,536711876
SJAG_00070 ribose 5-phosphate isomerase	5,54881	16,0533	-1,532619587
SJAG_01644 ATP-dependent DNA helicase Chl1	61,3883	176,78	-1,525919441
SJAG_04184 alpha-1,3-glucan synthase Mok13	3,85985	11,0751	-1,520703037
SJAG_00711 acid phosphatase	46,6358	132,85	-1,510288457
SJAG_02708 RecA family ATPase Rhp55	211,888	601,935	-1,506305821
SJAG_06631 hypothetical protein	85,5798	242,111	-1,500326415
SJAG_01306 hypothetical protein	10,0391	28,3132	-1,495844876
SJAG_04796 hypothetical protein	1,22178	3,37168	-1,46448309
SJAG_03600 rho guanine nucleotide exchange factor	6,83264	18,7565	-1,456875622
SJAG_00025 hypothetical protein	7,33335	20,067	-1,452280649
SJAG_03354 transcription factor tfiic complex a box associated subunit sfc1	19,6414	53,475	-1,444966812
SJAG_01368 methionyl-tRNA formyltransferase Fmt1	45,6918	124,387	-1,444828531
SJAG_04813 fork head transcription factor Fkh2	15,1372	41,1809	-1,443876992
SJAG_01667 dual specificity phosphatase Stp1	57,6524	156,38	-1,439603441
SJAG_01312 ubiquitin carboxy terminal hydrolase Ubp11	55,449	148,053	-1,416880377
SJAG_00383 RNA polymerase II associated protein	16,302	42,8748	-1,39508097
SJAG_00040 sister chromatid cohesion protein	44,318	116,475	-1,394055649
SJAG_00307 centromere-specific histone H3 CENP-A	336,571	875,14	-1,378602955
SJAG_00100 meiosis specific cyclin Crs1	0,70145	1,80329	-1,36221925
SJAG_04934 DNA-directed RNA polymerase III complex large subunit Rpc1	11,2561	28,9263	-1,361674747
SJAG_00238 glutathione S-transferase Gst1	12,7144	32,4388	-1,351257069
SJAG_01619 hypothetical protein	146,734	372,156	-1,342704296
SJAG_06392 hypothetical protein	87,2082	220,014	-1,335059629
SJAG_01711 SAGA complex subunit Ngg1	25,8181	64,6591	-1,324470592
SJAG_01451 hypothetical protein	24,7463	61,8818	-1,322302329
SJAG_03698 meiotic cohesin complex subunit Rec11	26,5138	66,2097	-1,320299139
SJAG_01518 peptide chain release factor	6,13843	15,3168	-1,319173304
SJAG_04303 meiotic recombination protein Rec25	22,3346	55,7026	-1,318464252
SJAG_02216 hypothetical protein	4,74604	11,8284	-1,317458772
SJAG_05280 eukaryotic protein	13,0732	32,5103	-1,314284548
SJAG_04833 hypothetical protein	8,16734	20,3057	-1,31394657
SJAG_04927 inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	6,27646	15,4373	-1,29839745
SJAG_01836 CAF1 family ribonuclease	6,73013	16,4925	-1,293103827
SJAG_03622 mediator complex subunit Med8	129,083	311,999	-1,273242392
SJAG_02758 ribosome biogenesis protein	167,609	401,805	-1,261395898
SJAG_00932 pre-60S shuttlingfactor	181,826	434,03	-1,255236254
SJAG_04717 membrane transporter	37,7973	90,0894	-1,253074186
SJAG_00759 RNA-binding protein Mcp2	5,90265	14,0137	-1,247403213
SJAG_04403 metallochaperone Ccs1	21,4874	50,9479	-1,245531756
SJAG_03984 zinc knuckle TRAMP complex subunit Air1	19,3564	45,7082	-1,239642348

SJAG_01606	60S ribosomal protein L7	238,726	559,463	-1,228687021
SJAG_01525	hypothetical protein	46,6222	109,171	-1,227500683
SJAG_00323	rRNA processing protein Rrp16	37,2507	87,1385	-1,226042743
SJAG_16454	hypothetical protein	30,8544	70,5411	-1,192987833
SJAG_00186	cysteine desulfurase Nfs1	93,8048	214,395	-1,192537608
SJAG_04080	GTPase regulator	3,52023	8,0435	-1,192153711
SJAG_05186	U3 snoRNP protein Utp20	11,7265	26,5877	-1,180986503
SJAG_03623	Ras1-Scd pathway protein Ral2	114,05	257,749	-1,176300384
SJAG_00911	complexed with Cdc5 protein Cwf4	46,6016	105,093	-1,173215184
SJAG_06204	hypothetical protein	1,02041	2,29582	-1,169860592
SJAG_04436	hypothetical protein	440,529	987,414	-1,164418106
SJAG_04939	bis(5'-adenosyl)-triphosphatase	16,9321	37,9432	-1,164080442
SJAG_01169	RNA-binding protein Mrd1	33,4727	74,727	-1,158644677
SJAG_02883	potassium ion transporter Trk2	8,5577	19,0382	-1,153602073
SJAG_00165	hypothetical protein	47,9432	106,457	-1,150872705
SJAG_02155	fluconazole resistance protein	82,4623	182,981	-1,149887247
SJAG_03319	DUF1752 family protein	58,7677	130,392	-1,149760016
SJAG_02102	mannosyltransferase complex subunit Alg1	51,4759	114,011	-1,147203971
SJAG_00301	RAVE complex subunit Rav1	71,7088	158,66	-1,145716374
SJAG_04920	gluconate transporter inducer Gti1	2,9197	6,45	-1,143482193
SJAG_00111	ATP-dependent DNA helicase	38,4794	84,9954	-1,14329846
SJAG_02662	U3 snoRNP-associated protein Utp16	2,88108	6,36053	-1,142537264
SJAG_03896	URM1 activating enzyme	68,9476	151,949	-1,140014941
SJAG_01286	CTD phosphatase Fcp1	38,7288	85,3283	-1,139617505
SJAG_00881	aspartate kinase	16,8758	37,1645	-1,138969304
SJAG_04692	ATPase with bromodomain protein	24,8016	54,5668	-1,137590246
SJAG_04198	RNA endoribonuclease	31,847	69,8976	-1,134085444
SJAG_01419	MutS protein 3	8,24483	18,0769	-1,13258564
SJAG_01367	hypothetical protein	32,4649	71,1482	-1,131946493
SJAG_01429	BRCT domain-containing protein	10,822	23,626	-1,12646768
SJAG_02496	D-amino acid oxidase	41,6279	90,3943	-1,118681023
SJAG_04730	hypothetical protein	91,097	197,509	-1,116442946
SJAG_01607	hypothetical protein	35,5888	77,0143	-1,113703062
SJAG_04882	ribose-phosphate pyrophosphokinase	100,515	215,034	-1,097153976
SJAG_02024	ribosome biogenesis protein Mra1	36,8546	78,7158	-1,094808545
SJAG_00158	triglyceride lipase-cholesterol esterase	33,4458	71,3997	-1,094092959
SJAG_01850	NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase ydfG	58,5921	124,174	-1,083585065
SJAG_01252	mago binding protein	18,7258	39,6147	-1,081008522
SJAG_00731	DNA-directed RNA polymerase I and III subunit Rpc19	353,14	746,957	-1,08078495
SJAG_03043	60S ribosomal protein L43-B	4123,69	8688,07	-1,075099845
SJAG_01811	ribosome biogenesis protein N	448,057	941,859	-1,071828821
SJAG_06599	hypothetical protein	5,21441	10,9557	-1,071105737
SJAG_02710	hypothetical protein	7,99404	16,7924	-1,070811741
SJAG_04085	diphthamide biosynthesis protein	45,1193	94,572	-1,067668422
SJAG_04799	hypothetical protein	3,36357	7,01146	-1,059721606
SJAG_03868	TatD DNase familv Scn1	29,9506	62,1235	-1,052554208

SJAG_01869	NADH/NADPH dependent indole-3-acetaldehyde reductase AKR3C2	1755	3592,58	-1,033549253
SJAG_00363	ww domain binding protein 11	14,3329	29,2719	-1,03018585
SJAG_03483	GPI anchored cell surface protein	8,79382	17,9373	-1,028400838
SJAG_02113	amino acid permease	7,17653	14,6289	-1,027462947
SJAG_01805	PLK protein kinase Pl01	14,5273	29,4957	-1,021738055
SJAG_04036	transcription factor Pap1/Caf3	84,3179	171,081	-1,020768704
SJAG_02214	SUMO deconjugating enzyme Ulp1	17,6717	35,8478	-1,02044375
SJAG_04840	tryptophan-tRNA ligase Msw1	13,9265	28,1257	-1,014056277
SJAG_00277	hypothetical protein	56,9986	115,061	-1,013400525
SJAG_01433	RNA lariat debranching enzyme Dbr1	9,04372	18,2279	-1,01116013
SJAG_02752	shuttle craft like transcriptional regulator	15,5713	31,3595	-1,010013161
SJAG_04904	protein disulfide isomerase	29,9305	60,2779	-1,010012776
SJAG_00980	ATP-dependent DNA helicase Rdh54	1,94756	3,90758	-1,004607635
SJAG_03206	transcription factor TFIIF complex ERCC-3 subunit	209,483	420,119	-1,003964863
SJAG_02622	YTH family protein Mmi1	33,3894	66,8083	-1,00063718

gene	value 1	value 2	log2(fold change)	
SJAG_03651	F-box protein Pof7	12,6268	6,29765	1,003603579
SJAG_00812	phosphatidyl-N-methylethanolamine N	490,997	244,874	1,003674609
SJAG_00181	aminopeptidase Ape2	632,117	314,904	1,005279532
SJAG_03204	phospholipase	27,2599	13,554	1,008061593
SJAG_00084	adenylyl-sulfate kinase	141,269	70,0681	1,011615235
SJAG_00372	plasma membrane proteolipid Pmp3	2475	1227,53	1,011670242
SJAG_01526	tubulin specific chaperone cofactor C	41,5569	20,6017	1,012324648
SJAG_01292	glutaredoxin Grx1	2134,74	1057,57	1,01330721
SJAG_01570	GPI inositol deacylase	10,7381	5,29968	1,018761589
SJAG_02886	gamma tubulin complex subunit Mod21	11,6851	5,7609	1,02030396
SJAG_03649	mitochondrial ribosomal protein subunit Yml6	7,9182	3,90181	1,021028981
SJAG_03117	hypothetical protein	30,2844	14,9161	1,021704454
SJAG_04952	dolichol-P-Man dependent alpha(1-3) mannosyltransferase Alg3	223,241	109,539	1,027157399
SJAG_02369	hypothetical protein	9,6753	4,74694	1,027308581
SJAG_02215	arrestin family protein	103,213	50,567	1,029356599
SJAG_05342	APC amino acid transporter	101,704	49,8036	1,030054486
SJAG_04870	diadenosine 5',5'''-p1,p6-hexaphosphate hydrolase Aps1	19,5399	9,50995	1,038913423
SJAG_03345	AAA family ATPase Cdc48	160,892	78,1495	1,041784045
SJAG_03396	CAA Xprenyl protease	239,575	116,27	1,042998468
SJAG_03390	hypothetical protein	30,2402	14,6126	1,049254783
SJAG_03805	ski complex TPR repeat subunit Ski3	12,8467	6,20642	1,049564579
SJAG_03401	arginine transporter Can1	20,4699	9,87235	1,052038607
SJAG_03384	STE/STE11 protein kinase	149,065	71,8462	1,052957798
SJAG_03712	methylenetetrahydrofolate reductase Met9	175,786	84,6683	1,053926348
SJAG_02237	hypothetical protein	7,22487	3,47806	1,054688808
SJAG_00487	SBDs family protein Rtc3	7532,49	3621,06	1,05671477
SJAG_01209	phosphoglucomutase	1374,85	659,924	1,058902434
SJAG_03404	endocytosis regulator	278,762	133,765	1,059333231
SJAG_02456	signal recognition particle subunit Sec65	48,7213	23,3363	1,06197679
SJAG_03659	S-adenosylmethionine synthetase	89,3024	42,7601	1,062433721
SJAG_03264	MT organizer Mto2	5,05151	2,41783	1,063001893
SJAG_03822	alcohol dehydrogenase Adh4	69,8533	33,4279	1,063275548
SJAG_01686	arrestin/PY protein 2	23,1609	11,0509	1,067527446
SJAG_02316	CASP family protein	28,2326	13,4548	1,06924105
SJAG_01290	cell wall protein Gas1	230,992	110,028	1,069972179
SJAG_03825	UbiE family methyltransferase	55,8796	26,5987	1,070965957
SJAG_04383	serpine1 like protein	333,585	158,59	1,072752614
SJAG_02568	hypothetical protein	1,5427	0,73339	1,072799135
SJAG_03648	inner membrane peptidase complex catalytic subunit	15,8171	7,51176	1,074262237
SJAG_01241	alkaline phosphatase	126,542	60,0682	1,074942965
SJAG_00057	hexose transporter Ght2	185,811	88,1328	1,076084966
SJAG_00349	Clr6 histone deacetylase complex subunit Alp13	31,4192	14,8988	1,076450311
SJAG_05198	hypothetical protein	114,429	54,222	1,07750249
SJAG_02780	membrane transporter	56,2255	26,5892	1,080384215
SJAG_01477	fungal protein	16,0843	7,5994	1,081695728

SJAG_04286 hypothetical protein	51,3729	24,104	1,091734938
SJAG_03220 kinetochore protein Mis12	19,2272	8,96424	1,100895503
SJAG_03660 phosphoglycerate kinase Pkg1	1142,98	532,845	1,101012328
SJAG_01017 endo-1,3-beta-glucanase Eng2	44,842	20,8836	1,102480194
SJAG_03816 hypothetical protein	30,6907	14,2409	1,107761226
SJAG_05235 splicing factor Spf38	13,897	6,42558	1,112874887
SJAG_03828 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	4,20868	1,93818	1,11866526
SJAG_01795 hydrolase	39,5746	18,2226	1,118845951
SJAG_02235 delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	54,6617	25,11	1,1222683
SJAG_03403 autophagy specific phosphatidylinositol 3-kinase complex subunit	309,934	141,762	1,128490165
SJAG_04193 hypothetical protein	908,248	415,245	1,129123487
SJAG_03387 Lid2 complex subunit Snt2	176,202	80,4934	1,130287899
SJAG_03861 glycine cleavage complex subunit P	31,1661	14,1774	1,136384653
SJAG_04864 cell wall protein Asl1	296,112	134,058	1,143285642
SJAG_04767 rRNA processing protein Rrp17	11,1799	5,05171	1,146063557
SJAG_04348 hypothetical protein	63,7411	28,76	1,148160241
SJAG_02616 meiotic chromosome segregation protein	8,45401	3,81342	1,148550384
SJAG_03423 60S ribosomal protein L13	421,948	190,098	1,150321861
SJAG_04227 fungal protein	75,1859	33,712	1,157199912
SJAG_00340 cell wall protein Ecm33	202,355	90,7284	1,157262375
SJAG_04579 nucleotide-sugar phosphatase	38,572	17,2643	1,159762113
SJAG_03376 STE/STE20/YSK protein kinase Sid1	16,8019	7,49312	1,164985925
SJAG_02324 ribosomal protein subunit S16	36,9087	16,4542	1,165505039
SJAG_00085 DUF423 protein	207,193	91,799	1,174424919
SJAG_02984 phosphoglycerate mutase family protein	125,238	55,4745	1,17477571
SJAG_00774 esterase/lipase	26,9713	11,9452	1,174994051
SJAG_00527 zinc finger protein Yth1	73,2442	32,4046	1,176515895
SJAG_02770 pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	239,079	105,406	1,181530422
SJAG_00994 hypothetical protein	32,8993	14,4942	1,182581181
SJAG_04295 allantoate permease	30,0729	13,2436	1,183168655
SJAG_01982 hypothetical protein	57,7237	25,3786	1,185551292
SJAG_03526 Lsd90 protein	411,005	180,402	1,187940612
SJAG_00144 GRIP domain-containing protein	46,4983	20,3875	1,189493095
SJAG_04674 hypothetical protein	235,392	102,205	1,203599513
SJAG_04723 cell agglutination protein mam3	11,9887	5,14823	1,219526815
SJAG_00625 hypothetical protein	5678,82	2438,12	1,219822049
SJAG_03394 transcriptional regulator	15,4932	6,63878	1,222645104
SJAG_01753 malate dehydrogenase	133,345	57,037	1,225193723
SJAG_03786 aldehyde dehydrogenase	762,062	325,078	1,229122454
SJAG_00936 peptidyl-tRNA hydrolase Pth1	39,9955	16,9626	1,237480367
SJAG_00449 cytochrome C oxidase copper chaperone Cox17	308,994	130,904	1,239069642
SJAG_02577 hypothetical protein	12,5981	5,33499	1,239648696
SJAG_03288 N-acetyltransferase Ats1	43,8467	18,5491	1,241119077
SJAG_00105 ribosomal protein subunit L51-b	40,7827	17,1775	1,247437208
SJAG_04484 19S proteasome regulatory subunit	101,689	42,5324	1,257529457
SJAG_03723 N-acetylglucosamine-phosphate mutase	135,793	56,774	1,258106817

SJAG_01959 Uba3-binding protein but2 // But2 family protein	6334,24	2627,31	1,269585095
SJAG_02285 deoxyhypusine hydroxylase	11,4101	4,73213	1,269749823
SJAG_04916 RNase P and RNase MRP subunit p30	20,1813	8,31626	1,279012342
SJAG_02784 hypothetical protein	27,4425	11,2907	1,281276983
SJAG_01723 60S ribosomal protein L8	31,9664	13,1185	1,284953511
SJAG_00257 hypothetical protein	6,04145	2,47171	1,289385365
SJAG_04525 hypothetical protein	40,5206	16,5771	1,289463893
SJAG_04243 hypothetical protein	3094,03	1263,32	1,292267064
SJAG_02975 hypoxia induced family protein	171,403	69,6469	1,299261316
SJAG_00036 hydantoin racemase family protein	26,1033	10,5867	1,301979251
SJAG_03878 alpha-1,2-mannosyltransferase	24,1237	9,76796	1,304322002
SJAG_04072 hypothetical protein	866,155	350,648	1,304601722
SJAG_02091 phospholipase B Plb1	81,6595	32,9907	1,307561345
SJAG_00781 P-factor pheromone Map2	107,185	42,8463	1,322860491
SJAG_03576 SWI/SNF and RSC complex subunit Ssr4	3,67373	1,46654	1,324829179
SJAG_02951 UDP-glucose 4-epimerase/aldose 1-epimerase, gal10	563,593	224,969	1,324927477
SJAG_01985 hypothetical protein	16,2645	6,4824	1,327126521
SJAG_00519 DUF962 family protein	44,6291	17,6195	1,340811729
SJAG_00370 squalene monooxygenase Erg1	34,4535	13,3819	1,36436758
SJAG_00937 glutamate decarboxylase	116,354	44,9592	1,371832539
SJAG_02950 galactokinase Gal1	219,915	84,4846	1,380185718
SJAG_01717 RNA binding protein Mlo3	122,78	47,1563	1,380553145
SJAG_00366 fungal protein	76,6478	29,3554	1,384618468
SJAG_01965 hypothetical protein	6,61563	2,52104	1,391859541
SJAG_04152 NADH dehydrogenase	182,92	69,4154	1,397885155
SJAG_04821 UDP-GlcNAc transferase associated protein Alg14	15,1798	5,75927	1,398194919
SJAG_03379 cytokinesis protein Cyk3	41,5025	15,7068	1,401808958
SJAG_06622 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	33,4488	12,651	1,402703027
SJAG_04007 fungal protein	39,4467	14,9129	1,403343778
SJAG_04043 hypothetical protein	43,4796	16,3641	1,409804409
SJAG_02341 ubiquitin carboxy terminal hydrolase Uch2	46,3132	17,3398	1,417336185
SJAG_02734 pyruvate decarboxylase	5,30232	1,97599	1,424048095
SJAG_01155 fungal protein	3,77848	1,3963	1,436197043
SJAG_02234 coatomer epsilon subunit	100,725	37,1744	1,438040443
SJAG_02796 pyruvate kinase	310,217	114,377	1,439480778
SJAG_05005 fungal protein	547,946	201,82	1,440964573
SJAG_02236 proline-tRNA ligase	63,2924	23,2638	1,443945503
SJAG_03974 extender-the chronological lifespan protein Ecl2	1298,87	473,64	1,455394213
SJAG_04055 heat shock protein S	1788,67	652,006	1,455930097
SJAG_03903 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	20,4668	7,40484	1,466745086
SJAG_02989 cytoskeletal signaling protein	102,518	36,9462	1,472379346
SJAG_01664 hsp90-like protein	1254,54	450,137	1,47872241
SJAG_02567 phosphoprotein phosphatase	279,988	100,429	1,479189072
SJAG_01412 RNA-binding protein	6,88324	2,46021	1,484306347
SJAG_03388 transcription factor Hsr1	65,2431	22,9032	1,510276149
SJAG_00555 zf-PARP type zinc finger protein	51,1196	17,8322	1,519391845

SJAG_01944 CCR4-Not complex subunit Caf16	90,2507	31,3577	1,525118376
SJAG_00803 arrestin/PY protein 1	33,2346	11,5225	1,528232223
SJAG_03937 RNA-binding protein	29,906	10,2622	1,543094912
SJAG_03907 COPII-coated vesicle component Sec13	73,1098	25,0599	1,544684147
SJAG_00218 cell wall protein Gas5	64,3065	21,9785	1,548871642
SJAG_02858 CAMK/CAMK1 protein kinase Cmk1	20,426	6,96254	1,552721095
SJAG_05301 origin recognition complex subunit Orp3	16,6406	5,65596	1,556863631
SJAG_03393 metallopeptidase	20,522	6,96026	1,559958234
SJAG_01846 But2 family protein But2	299,945	101,565	1,562294657
SJAG_00223 hsp9-like protein	8098,24	2739,46	1,563716861
SJAG_03377 phospholipase	45,9682	15,5063	1,567781693
SJAG_03580 phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	356,808	120,227	1,569387036
SJAG_00303 histone H4 h4.2	293,999	98,8972	1,571809667
SJAG_03374 septin Spn4	740,273	248,99	1,571969609
SJAG_01689 hypothetical protein	4,97724	1,67011	1,575402827
SJAG_02233 G-protein alpha subunit	39,7961	13,3526	1,575506365
SJAG_02968 iron/zinc ion transporter	20,7078	6,94404	1,576327126
SJAG_00995 transcription factor TFIIF complex subunit Rad15	35,1323	11,7708	1,577585652
SJAG_04944 coproporphyrinogen III oxidase	78,1023	26,1667	1,577633043
SJAG_03395 inner membrane protein Mdm31	79,1722	26,209	1,594931632
SJAG_00674 succinate-semialdehyde dehydrogenase	58,4808	19,3568	1,595122576
SJAG_02122 hypothetical protein	421,884	137,544	1,616953167
SJAG_01245 cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit Cgs1	977,35	318,614	1,617065639
SJAG_04376 peptidase	1076,19	349,634	1,622015415
SJAG_03958 xylose and arabinose reductase	146,192	47,308	1,62770829
SJAG_01216 glutathione peroxidase Gpx1	3612,22	1164,24	1,633497271
SJAG_03603 high-mobility group non-histone chromatin protein	613,952	197,444	1,63668234
SJAG_01199 thioredoxin peroxidase Tpx1	1966,67	626,86	1,64953972
SJAG_00367 hypothetical protein	34,0862	10,844	1,652290756
SJAG_03818 gal10, UDP-glucose 4-epimerase/aldose 1-epimerase	73,0215	23,1382	1,658044668
SJAG_00698 CCAAT-binding factor complex subunit Php2	92,3545	29,1514	1,663617088
SJAG_02960 flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase family protein	372,59	116,824	1,673252266
SJAG_03641 glycine decarboxylase complex subunit H	129,948	40,6714	1,675847872
SJAG_01861 hypothetical protein	185,567	57,981	1,678288053
SJAG_00409 glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	256,986	80,1207	1,681442836
SJAG_04953 cytosolic thioredoxin Trx1	2857,51	876,347	1,705184407
SJAG_02338 non classical export pathway protein	857,321	259,447	1,724395629
SJAG_03398 arginase Car3	317,981	91,5507	1,796297742
SJAG_04299 uricase	18,9256	5,39027	1,811909594
SJAG_02987 hypothetical protein	71,1353	19,9815	1,831900767
SJAG_01578 fungal protein	12,795	3,5817	1,836863739
SJAG_03815 hsp16-like protein //hypothetical protein	14468,8	3896,99	1,892513139
SJAG_01998 general amino acid permease GAP1	8,73998	2,34259	1,899525502
SJAG_04570 fungal protein	18,6082	4,87684	1,931919962
SJAG_02626 protein kinase inhibitor	907,861	237,366	1,935358128
SJAG_05182 allantoin permease	19,3888	4,96947	1,964059616

SJAG_02961	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	255,439	64,5141	1,985292399
SJAG_01416	pig-L	7,66588	1,85502	2,047016673
SJAG_00027	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	77,3797	18,3811	2,07373203
SJAG_00699	tspO/peripheral benzodiazepine receptor	1179,88	274,717	2,102622042
SJAG_02697	ubiquitinated histone-like protein Uhp1	836,892	192,1	2,123183938
SJAG_00053	MSP domain-containing protein	32,0408	7,22	2,149839427
SJAG_04684	ER chaperone SHR3 ue Psh3	51,7653	11,5251	2,167206067
SJAG_03303	manganese superoxide dismutase	1783,77	385,445	2,210332687
SJAG_02744	cytochrome c	639,032	137,021	2,221491158
SJAG_01757	hypothetical protein	21,2808	4,4255	2,265640019
SJAG_02788	fungal protein	1,7318	0,35785	2,274829317
SJAG_01983	PTR family peptide transporter	7,00094	1,39934	2,322802103
SJAG_03049	fungal protein	461,342	88,7946	2,377292792
SJAG_03653	thioredoxin reductase Trr1	177,494	29,361	2,595797246
SJAG_01095	hypothetical protein	23,5876	3,57762	2,720956571
SJAG_01553	hypothetical protein	8,72883	1,28541	2,763559689
SJAG_04068	high-affinity fructose transporter ght6	114,034	16,0335	2,830302743
SJAG_02988	hypothetical protein // ThiJ domain-containing protein	121,352	15,4163	2,976669429
SJAG_04458	NAD binding dehydrogenase	2752,74	263,992	3,382302236
SJAG_03203	hypothetical protein	406,375	30,2267	3,748916264
SJAG_03644	glycerophosphodiester transporter	32,3747	2,03101	3,994597576
SJAG_00110	But2 family protein	107,797	4,87967	4,465389633
SJAG_01096	amino acid permease	10,7493	0,42899	4,647161612