

Transzkripciós faktorok vizsgálata *Schizosaccharomyces pombe*-ban

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a doktorjelölt neve: Pataki Emese

a témavezető neve: Gálné Dr. Miklós Ida Tanszékvezető, egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM Természettudományi Doktori Tanács Juhász- Nagy Pál Doktori Iskola Debrecen, 2017

A doktori értekezés betétlapja

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

Debrecen, 2017.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Doktorjelölt neve doktorjelölt 2012-2015 között a fent megnevezett Doktori Iskola biológia doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2017.

a témavezető aláírása

Tanúsítom, hogy Pataki Emese doktorjelölt 2012-2015 között a fent megnevezett Doktori Iskola biológia doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom. Debrecen, 2017.

a témavezető aláírása

A doktori értekezés betétlapja

Transzkripciós faktorok vizsgálata Schizosaccharomyces pombe-ban

Investigation of *Schizosaccharomyces pombe* transcription factors

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében Biológia tudományágban Írta: **Pataki Emese** okleveles Molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája** (**Biológia** programja) keretében

Témavezetők: Gálné Dr. Miklós Ida Tanszékvezető, egyetemi docens

A doktori szigorlati bizottság: elnök: Prof. Batta Gyula tagok: Dr. Pfeiffer Ilona Dr. Penyige András

A doktori szigorlat időpontja: 2015. 11. 12.

Az értekezés bírálói:

A bírál	óbizottság:	
elnök:		
tagok:		

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzés	6.oldal
2.	Irodalmi áttekintés	9.oldal
	2.1 A hasadó élesztőcsoport jellemzése	9.oldal
	2.2 Transzkripciós faktorok az S. pombe-ban	10.oldal
	2.3 A fork-head típusú transzkripciós faktorok	12.oldal
	2.4 Az rsv1 cink-ujj típusú transzkripciós faktor	13.oldal
	2.5 A nitrogén és glükóz érzékelése S. pombe-ban	14.oldal
	2.6 Target of rapamycin (TOR)	17.oldal
	2.7 A hasadó élesztő, mint a TOR útvonal	23.oldal
	tanulmányozására alkalmas modellszervezet	
3.	Anyagok és módszerek	29.oldal
	3.1 A doktori munka során felhasznált törzsek	29.oldal
	3.2 A doktori munka során felhasznált plazmidok	30.oldal
	3.3 A doktori munka során felhasznált primerek	30.oldal
	3.4 Felhasznált tápközegek és oldatok	32.oldal
	3.5 Molekuláris biológiai módszerek	34.oldal
	3.6 Klasszikus módszerek	44.oldal
4.	Eredmények	48.oldal
	4.1 Az <i>fhl1</i> gén vizsgálata	48.oldal
	4.1.1 A ∆fhl1 által szabályozott gének azonosítása	48.oldal
	4.1.2 Az fhl1 által szabályzott gének funkciójának	51.oldal
	megállapítása felfedte, hogy az <i>fhl1</i> szabályozza	
	a nitrogén éhezésre indukálódó géneket	
	4.1.3 Az <i>fhl1</i> szabályozása alatt állnak a	52.oldal
	párosodás és a sporuláció folyamatában fontos gének	

4.1.4 Átfedés az <i>fhl1</i> és a <i>tor2</i> által szabályozott	55.oldal
gének között	
4.1.5 Az <i>fhl1</i> gén túltermelése csökkenti a	56.oldal
tor2-ts sejtek hőmérséklet- és rapamycin érzékenységét	
4.1.6 Az <i>fhl1</i> ⁺ gén túltermelése nincs hatással	61.oldal
a <i>∆tor1</i> sejtek hőmérséklet érzékenységére	
4.1.7 Az <i>fhl1</i> feltehetően szabályozza a	62.oldal
transzporfolyamatok egy részét is	
4.1.8 Az <i>fhl1</i> transzkripciós faktor által	63.oldal
szabályozott géneknek csak egy része tartozik	
Sep10 szabályozása alá	
4.2 Az rsv1 gén vizsgálata	65.oldal
4.2.1 Az rsv1 gén homológjainak meghatározása	65.oldal
4.2.2 Konzervatív domének analízise	67.oldal
4.2.3 Az <i>Arsv1</i> mutáns fenotípusának vizsgálata	68.oldal
4.2.4 Fajok közötti komplementációs vizsgálat	69.oldal
5. Diszkusszió	74.oldal
6. Összefoglalás	79.oldal
7. Summary	82.oldal
8. Köszönetnyilvánítás	85.oldal
9. Irodalomjegyzék	86.oldal
10. Függelék	103.oldal
11. Publikációs lista	116.oldal

1. Bevezetés és célkitűzés

A transzkripciós faktorok felelősek azért, hogy a testünket felépítő sejtek különböző funkciók ellátására képesek azáltal, hogy kontrollálják, mely gének legyenek aktívak a genomban. Fontos szerepet játszanak az intracelluláris szignalizáció révén a legtöbb sejtfolyamatban, mint például a sejtosztódás és a sejtelválás folyamatában. Így a transzkripciós faktorokban keletkezett mutációk olyan betegségek kialakulásához vezethetnek, mint az autoimmun betegség, daganatos betegség vagy a diabetész (Semenza, 1999).

A Genetika és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék egyik kutatási területe a sejtciklus vizsgálata. Ezen belül is kitüntetett figyelmet fordítanak a citokinezis genetikai hátterének vizsgálatára. A sejtszeparációban sérült mutánsokat elsőként Sipiczki Mátyás és munkatársai izolálták S. pombe-ben és a sérült géneket "sep" géneknek nevezték el. Ezek a gének a sep1⁺, sep10⁺, sep11⁺, sep15⁺ (Ribar és mtsai, 1997; Grallert és mtsai, 1999). A kutatócsoport megfigyelései alapján ezek a gének hibái nem csupán a citokinezis folyamatában okoznak kárt, hanem differenciálódási vagy stresszrezisztencia problémákat is eredményeznek (Grallert és mtsai, 1999). A jelenség hátterében az áll, hogy ezek a gének transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek a citokinezishez szükséges gének mellett további géncsoportokat is szabályoznak. (Zilahi és mtsai, 2000, 2000a; Miklos és mtsai, 2008). A sep10 és sep15 génekről például kiderült, hogy a mediátor komplex egyes alegységeit kódolják, és több száz gén transzkripciójára hatással vannak (Linder és Gustafsson, 2004; Zilahi és mtsai, 2000; Miklos és mtsai, 2008). E gének egy részét feltehetően közvetlenül, a másik részét pedig közvetetten befolyásolják.

Azért, hogy jobban megismerjük a mediátor komplex Sep10 alegysége által regulált géneket, azok evolúciós konzervativizmusát, és közelebb jussunk a Sep10 protein által befolyásolt szignáltranszdukciós útvonalak megismeréséhez, a doktori munkám során két olyan gént tanulmányoztam behatóbban, melyek expressziós szintje jelentősen csökkent a *sep10* deléciós mutánsban (Miklos és mtsai, 2008).

Az egyik az *fhl1* gén volt, mely önmaga is egy transzkripciós faktort kódol, s egyike az *S. pombe*-ban ismert négy fork-head típusú transzkripciós regulátornak. Azonban a funkciója még ismeretlen e fajban, szemben a másik három fork-head génnel. Célunk tehát az *S.pombe fhl1* fork-head típusú transzkripciós faktor funkciójának megismerése volt, amit az alábbi kísérletek elvégzése révén kívántunk elérni:

- Az *fhl1* transzkripciós faktor target génjeinek meghatározása mikroarray analízis segítségével.
- A génexpressziós vizsgálat adatainak analízise, a regulált gének funkciójának kiderítése.
- 3) A mikroarray adatok validálása kísérletekkel.
- Célunk volt továbbá az *fhl1* gén és a TOR útvonal lehetséges kapcsolatának felderítése.

A másik, a doktori munka során vizsgált gén az rsv1 volt, amely szintén megváltozott expressziós szintet mutatott a $\Delta sep10$ mutánsban (Miklos és mtsai, 2008). Az rsv1 egy cink-ujj típusú transzkripciós faktort kódol, amely a glükóz éhezés hatására stacioner fázisba lépő sejtek túléléséhez szükséges (Hao és mtsai, 1997). Mivel a korábbi adatok alapján a glükóz éhezésre adott válaszreakcióban résztvevő gének evolúciósan igencsak konzervatívak

(Ozcan és Johnston, 1999; Santangelo, 2006; Papp és mtsai, 2016), így ezt feltételeztük az S. pombe Rsv1 proteinről is, melynek homológjai megtalálhatók más fajokban is, mint pl. Aspergillus nidulans-ban, Saccharomyces cerevisiae-ben és emlősökben is (Hao és mtsai, 1997, http://genomebrowser.pombase.org). Azt azonban, hogy funkciójukban is hasonlítanak-e a homológ gének, illetve az általuk kódolt fehérjék, nem lehet megmondani csupán a bioinformatikai vizsgálatok alapján. Azaz, a fajokban megtalálható homológ proteinek különböző funkcionális homológiáját csak kísérletesen lehet igazolni. Így, jelen doktori tanulmányban a rsv1 gén további homológjainak meghatározása és ezek funkcionális homológiájának bizonyítása volt a cél, az alábbi kísérletek révén:

- A S. pombe rsv1 gén homológjainak meghatározása a közeli rokon hasadó élesztőkben illetve a távolabbi rokon Candida albicansban.
- 2) A homológ gének által kódolt proteinek szekvenciaanalízise.
- A homológ gének fajok közötti funkcionális komplementációs analízise.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A hasadó élesztőcsoport jellemzése

A Schizosaccharomyces hasadó élesztők csoportjába négy faj tartozik. Ezek a Schizosaccharomyces pombe (Linder, 1893), S. octosporus (Beijerinck, 1894), S. japonicus (Yukawa és Maki, 1931) és S. cryophilus (Helston és mtsai, 2010). Közülük a S. pombe jól ismert kutatási modellszervezet. Rendkívül alkalmas szervezet a genetikai, citológiai és molekuláris biológiai kutatásokra, hiszen a sejtjei eukarióta felépítésűek. Ugyanakkor haploid kromoszóma állománnyal rendelkezik, ami lehetővé teszi, hogy bármilyen mutáció következményét azonnal vizsgálhassuk, hiszen Éppen közkedveltsége megnyilvánul fenotípusosan is. azonnal az eredményeként került be azon szervezetek körébe, amelyeknek a teljes genetikai állománya szekvenálásra került (https://www.pombase.org)(Wood és mtsai, 2002, 2012). Ráadásul a sejtjei gyorsan szaporodnak és nagyon laboratóriumi körülmények könnyen tenyészthetők között. Ε modellszervezettel végzett kutatásaiért kapott Nobel Díjat Sir Paul Nurse is 2001-ben.

Az *S. japonicus* eltér a csoport többi tagjától abban a tulajdonságában, hogy képes a dimorfizmusra (Sipiczki és mtsai, 1998a; 1998b). A dimorfizmus, mint ahogyan a kifejezés sugallja, a sejteknek kétféle morfológiai előfordulását jelenti. A dimorfizmust mutató gombák képesek az egysejtű élesztő formából a többsejtű hifás növekedésbe átváltani. Ez a tulajdonsága azért figyelemreméltó, mert számos patogén gombára, beleértve a humán patogén *Candida albicanst*, jellemző ez a képesség. Általában a hifaképzés kapcsolatba hozható a gombák patogenitásával, s a hátterében komoly génkaszkádok működése húzódik meg (Sonneborn és mtsai, 2000; Papp és mtsai, 2016). A hifa képzése során a sejtek feltehetően felfüggesztik a sejtszeparációban szereplő gének működését, azaz sokban hasonlíthatnak az *S. pombe* citokinezis mutánsaihoz (Batta és mtsai, 2009; Grallert és mtsai, 1997; Grallert és mtsai, 1998; Grallert és mtsai, 1999). Az egyébként nem fertőző *S.japonicus* tehát potenciális modellszervezete lehet a dimorfizmus kutatásának, hiszen e fajnak is ismert a teljes genom-szekvenciája (<u>http://fungidb.org/fungidb/</u>).

Az S. pombe legközelebbi rokona a Schizosaccharomycesek közül az S. octosporus. Az S. pombe-hez hasonló az életciklusa, azonban míg az S. pombe négy spórás aszkusszal rendelkezik, addig az S. octosporus nyolc spórás aszkuszt képez (Beijerinck, 1894; Kurtzman és mtsai, 2011). A hasadó élesztő csoport negyedik ismert faja az S.cryophilus. Helston és munkatársai által került leírásra 2010-ben (Helston és mtsai, 2010). Elnevezése az alacsony hőmérséklet preferenciáján alapul, sejtjei ugyanis alacsony hőmérsékleten, 25°C-on formálnak inkább telepet.

2.2 Transzkripciós faktorok az S. pombe-ban

A transzkripciós faktorok a gének szabályozó régiójához specifikusan tudnak kötődni, s képesek aktiválni vagy gátolni az adott gén expresszióját. Ezáltal a transzkripciós faktorok kulcselemeknek tekinthetők a különböző sejttípusok kialakításában a többsejtű élőlények esetében. Ugyanakkor egysejtű organizmusokban, mint például a hasadó élesztő *S. pombe* esetében, a funkcionális és fiziológiai alkalmazkodást teszik lehetővé (Dongrong és mtsai, 2003). Mindez azáltal lehetséges, hogy egy-egy transzkripciós faktor funkciója szerteágazó, hiszen több különböző sejtfolyamatban szerepet játszó gén expresszióját tartja kontroll alatt. Számuk igen jelentős, az *S. pombe*-ban a traszkripciós faktorok a genom kódoló régiójának 1,9%-át teszik ki, mely

érték a legalacsonyabb az Ascomicetesek között. *Saccharomyces cerevisiea*ben ez az érték 2,6%, *Candida albicans*-ban 2,9%, míg *Aspergillus nidulans*ban 3,7 % (Chua 2013). Chua 2013-ban közölt *S. pombe* transzkripciós faktorokat tanulmányozó cikke szerint a hasadó élesztőben ~100 transzkripciós faktor mintegy ~5200 gén expresszióját szabályozza (Chua 2013).

A DNS kötő doménjük alapján a transzkripciós faktorokat három csoportba sorolhatjuk, melyek további alcsoportokra bonthatók. 1) cink-ujj doménnel rendelkező transzkripciós faktorok, 2) hélix-kanyar-hélix típusú és 3) cipzár típusú doménnel kötődő transzkripciós regulátorok (1. ábra)(Wilson és mtsai, 2008).



1.ábra A transzkripciós faktorok három fő csoprtjának a szerkezete http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_b ook/ch02s04.html

Ezek közül *S. pombe*-ban mindhárom típusú doménnel rendelkező transzkripciós regulátort azonosítottak, bár a legtöbbjük a cink-ujj típusú doménnel rendelkezik (Chua 2013). Funkciójukat tekintve az *S. pombe* transzkripciós faktorok ~17%-a a párosodás és a meiózis folyamatában játszik szerepet, ~16% a sejtciklus regulációjában, ~11% a metabolizmusban, ~8% a stressz válasz kialakításában, ~4% az ion homeosztázis fenntartásában fontos, míg ~3% a sejtek aggregációjában játszik szerepet (Chua 2013, Vachon és mtsai, 2013). A transzkripciós faktorok azonban nem véletlenszerűen szabályozzák az alájuk rendelt géneket, hanem többnyire egy-egy bonyolult szignáltranszdukciós kaszkád tagjai, melyek megismerése kiemelten fontos, hiszen ez vezethet el bennünket a különböző sejtfolyamatok működésének megértéséhez.

2.3 A fork-head típusú transzkripciós faktorok

A fork-head típusú transzkripciós faktorok a hélix-kanyar-hélix típusba tartoznak. szekvencia specifikus regulátorokként ismertek. mivel rendelkeznek egy konzervatív DNS-kötő doménnel (1. ábra). Elsősorban a sejtosztódás és a szexuális differenciáció folyamatában játszanak szerepet (Gajiwala és Burley, 2000; Angad és mtsai, 2017). Az S. pombe négy olyan génnel rendelkezik, amely fork-head típusú transzkripciós faktort kódol. Ezek a sep1, mei4, fkh2, fhl1 (http://fungidb.org/fungidb/). Funkciójukat tekintve mindannyian a meiózis folyamatához köthetők. mei4 a fő regulátora a meiózis késői szakaszában fontos géneknek (Horie és mtsai, 1998), míg az *fkh2* gén deléciója csökkent fertilitást, illetve fokozott stressz érzékenységet eredményez (Buck és mtsai, 2004; Bulmer és mtsai, 2004; Szilágyi és mtsai, 2005). A sep1 a sejtszeparációban szerepet játszó gének expresszióját szabályozza (Sipiczki és mtsai, 1993; Ribár és mtsai, 1997). A negyedik forkhead típusú transzkripciós faktor az *fhl1*, erről azonban még elég keveset tudunk. A tanszékünkön végzett korábbi kísérletek eredményei alapján feltételezhetően szerepet játszik a sejtciklus folyamatában, mivel a $\Delta fhl1$ sejtek osztódási ideje hosszabb, a vad típusú sejtek osztódási idejéhez képest (Szilágyi és mtsai, 2005).

Szintén négy fork-head típusú transzkripciós faktort azonosítottak Saccharomyces cerevisiae-ben is. Ezek közül három (FKH1, FKH2, HCM1) különböző sejtciklus folyamatokban szerepet játszó gének transzkripcióját szabályozza (Kumar és mtsai, 2000; Zhu és Davis, 1998), míg a negyedik, az FHL1 gén, a riboszómális protein gének expresszióját szabályozza, s a TOR útvonal regulációja alatt áll (Martin és mtsai, 2004).

2.4 Az rsv1 cink-ujj típusú transzkripciós faktor

A cink-ujj típusú transzkripciós faktorok DNS-kötő doménjét egy fémion, a Zn^{2+} stabilizálja (1. ábra). A *S. pombe rsv1* (required for stationary phase viability) két cink-ujj motívummal rendelkező transzkripciós faktor. Egy olyan 47 kDa méretű proteint kódol, amely a glükóz éhezés hatására aktiválódó gének expresszióját szabályozza. A *S. pombe rsv1* protein szekvenciája részben homológ az *Aspergillus nidulans* CreA génjével, a *Saccharomyces cerevisiae* Mig1 és az emlős EGR1 protein szekvenciájával, főként a cink-ujj domén régióban (Hao és mtsai, 1997). E géneknek a glükóz metabolizmusban, karbon-katabolit represszióban és az autolízisben van szerepe (Strauss és mtsai, 1999; Emri és mtsai, 1988; Carlson, 1999; Wang és mtsai, 2015).

A stacioner fázis egy olyan különleges állapota a sejtnek, amikor a sejt kikapcsolva tartja azon géneket, amelyek a mitózishoz szükségesek. Míg

azok a gének, amelyek a szélsőséges feltételek melletti túlélést teszik lehetővé, aktiválódnak (Boucherie, 1985; Werner és mtsai, 1993; Bataille, 1991). Ilyen veszélyeztető körülmény például a tápanyaghiány, különböző környezeti stressz, beleértve a restriktív hőmérsékletet és a különböző kemikáliák jelenlétét. Következésképpen a nyugalmi fázisú sejtek tartaléktápanyagot halmoznak fel, megvastagodott sejtfallal rendelkeznek, hogy ellenállóbbak legyenek a környezeti stresszel szemben (Herman, 2002; Pletnev és mtsai, 2015; Drebot és mtsai, 1990; Lillie és Pringle, 1980). Ennek megfelelően az *rsv1* deléciós mutáns sejtek is érzékenyek etanolra és sejtfalkárosító ágensre, illetve magas hőmérsékletre (Hao és mtsai, 1997). Ezen kívül a gén hiánya hidroxiurea és tiabendazol érzékenységet (Pan és mtsai, 2012), illetve fokozott szénhidrát metabolizmust okoz (Mata és Bahler, 2006).

2.5 A nitrogén és glükóz érzékelése S. pombe-ban

A nitrogén nélkülözhetetlen tápanyag, amely az aminosavak, nukleotidok szintéziséhez szükséges, illetve egyéb sejtkomponensek alapanyaga. A nitrogén szignál érzékelése és közvetítése egy igen finoman szabályozott kaszkádon keresztül történik (Yanagida és mtsai, 2011). Az élesztősejtek különböző nitrogénforrást képesek érzékelni és hasznosítani. A nitrogén mennyisége és minősége is meghatározó jelentőségű. Jó minőségű nitrogénforrásnak a glutamin és ammónium számítanak, mivel ezek képesek gyors növekedést indukálni és csökkenteni a NCR (nitrogene catabolic repression) gének aktivitását (Cooper, 2002). *S. pombe*-ban nitrogénéhezés hatására az expressziós szint a gének 50%-ánál emelkedett vagy csökkent szintet mutatott, a nitrogénben gazdag környezetben megfigyelt expressziós szinthez viszonyítva (Mata és mtsai, 2002). Tekintve, hogy a nitrogén a

természetben is limitált mennyiségben van jelen, a nitrogén forrás kulcsfontosságú a sejtek növekedéséhez. Amikor a *S. pombe* sejtek nitrogénre éheznek, két út közül választhatnak. Az egyik út a meiózis, amennyiben az ellentétes párosodási típusú partner jelen van. A másik lehetőség pedig a G0, nyugalmi fázisba lépés (2. ábra).



2. ábra A hasadó élesztők életciklusa. (MacNeill és Nurse, 1997)

Mindkét út olyan sejteket vagy spórákat eredményez (2. ábra), amelyek hosszú távon eredményesebben tudják fenntartani az életképességüket, mint a vegetatívan növő sejtek. A szexuális ciklusba való belépés kulcsregulátora a *stel1* transzkripciós faktor, amely a TOR és PKA útvonalak által szabályozódik (Valbuena és Moreno, 2010), s önmaga is megközelítőleg 80 olyan egyéb gén expresszióját szabályozza (beleértve önmagát), amelyek

nélkülözhetetlenek a sejtek párosodásának folyamatában (Kunitomo és mtsai, 2000; Mata és Bahler, 2006; Sugimoto és mtsai, 1991).

A másik fontos alapvető tápanyag a glükóz, mely kedvező, s elsődleges szénforrás a legtöbb sejt számára, beleértve az élesztő sejteket. S. pombe-ban a glükóz érzékelése főként a cAMP/PKA szignál útvonalon keresztül történik, csakúgy, mint az emlős sejtek esetében (Hoffman, 2005). A glükóz szignált a Git3 (G-protein receptor) és a Gpa/Git5/Git11 Gproteinek által alkotott komplex közvetíti a cAMP/PKA regulátorokhoz (Welton és Hoffman, 2000). A cAMP aktivitásának emelkedése pozitívan hat a protein kináz A útvonal aktivitására (Hoffman, 2005). Glükóz éhezés hatására csökken a Pkal aktivitása, amelynek következménye, a sejtek szexuális ciklusba lépése és a glükoneogenezis aktiválódása, amely részben a cink-ujj transzkripciós faktor Rst2 foszforilációján keresztűl valósul meg (Higuchi és mtsai, 2002). Az Ssp2 egy AMP kináz, amely szintén részt vesz a glükóz szignál közvetítésében. Amikor a glükóz limitált mennyiségben van jelen, Ssp2 aktiválódik és foszforilálja az Scr1 transzkripciót represszáló faktort (Matsuzawa és mtsai, 2012). Glükóz hiányában a cAMP/PKA útvonal mellett a MAPK kaszkád effektora, a Pmk1 is aktiválódik (Barba és mtsai, 2008). Glükóz éhezés vagy ozmotikus stressz hatására a kis GTPáz Rho2 pozitívan hat a pmk1-MAPK aktivitására a Pck2 protein kináz C fehérjén keresztül (Madrid és mtsai, 2013). Glükóz jelenlétében a TORC2-Gad8 útvonal is aktiválódik. A glükóz szignál a TORC2-Gad8 útvonalhoz a cAMP/PKA útvonal pozitív regulációján és a Pmk1-MAPK kaszkád negatív regulációján keresztül közvetítődik (Cohen és mtsai, 2014).

2.6 Target of rapamycin (TOR)

A TOR rövidítés a Target of rapamycin kifejezésből származik, amely olyan proteineket jelöl, amelyeknek az aktivitása rapamycinnel meggátolható. A rapamycint a Húsvét-szigeteken élő (avagy a bennszülöttek nyelvén Rapa nui sziget) Streptomyces hygroscopicus nevű baktérium termeli (Kojima és mtsai, 1995: Heitman és mtsai. 1991). А rapamycint kezdetben" immunszuppresszáns szerként alkalmazták a klinikumban transzplantáción átesett betegek kezelésére, s azt a tulajdonságát használták fel, hogy képes csökkenteni az immunválaszt azáltal, hogy meggátolja a G0 állapotú Tlimfocitáknak a sejtciklusba való belépését (Terada és mtsai, 1993).

2.6.1 TOR proteinek

A TOR proteineket *S. cerevisiae*-ben fedezték fel egy genetikai szelekciós kísérlet során, ahol a *tor1* és *tor2* mutánsok rapamycinre rezisztensnek bizonyultak (Heitman és mtsai, 1991). Toxicitásának kifejtéséhez a rapamycin egy ko-faktort is igényel, a peptidil-prolil cisz/transz izomeráz, FKBP12-t. A rapamycin az FKBP12-vel komplexet formálva képes meggátolni a TOR protein aktivitását (Heitman és mtsai, 1991). Minden napjainking vizsgált eukarióta élőlényben megtalálhatók a TOR proteinek homológjai, beleértve a gombákat, férgeket, növényeket, rovarokat és emlősöket. A TOR proteinek a szerin threonin kinázok csoportjába tartoznak és konzervatívak a gombáktól az emlősökig (Kanoh és Yanagida, 2007; Loewith és mtsai, 2002; Jacinto és Lorberg, 2008). A TOR fehérjék nagyméretű molekulák (~280kDa), amelyek számos domént is tartalmaznak (https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR026683/domain-organisations).

A molekula N-terminális részén kiterjedt tandem ismétlődő HEAT elemek találhatók, amelyeknek a fehérje-fehérje interakcióban van szerepük. A C-

terminális része a molekulának tartalmazza azon doméneket, amelyek a protein kináz jellegét adják a fehérjének, mint például a kináz domén illetve a mellette található FRB (FKBP12-rapamycin binding) domén (Andrade és Bork, 1995; Jacinto és Lorberg, 2008; Wullschleger és mtsai, 2006) (3. ábra).



3. ábra A *S.cerevisiae* TOR Complex 1 (TORC1) and TOR Complex 2 (TORC2) és a Tor proteinek doménjei (Wullschleger és mtsai, 2006)

2.6.2 A TORC komplexek

Magasabb rendű eukariótákban egyféle TOR gén ismert, szemben a sarjadzó és hasadó élesztővel, amelyek két különböző TOR génnel rendelkeznek (Wullschleger és mtsai, 2006). A TOR proteinek két jól elkülöníthető komplexben vannak jelen, (TOR complex 1) TORC1 és (TOR complex 2) TORC2 (3, 4. ábra). A legtöbb eukarióta élőlényben a TORC1 pozitívan hat a sejtnövekedésre a tápanyag elérhetőség, növekedési faktorok és stressz faktorok függvényében azáltal, hogy aktiválja az anabolikus folyamatokat, mint például a protein szintézist, és gátolja a katabolikus folyamatokat, az autofágiát (4. ábra) (Wullschleger és mtsai, 2006; Loewith és mtsai, 2002). Következésképpen, TORC1 számos eukariótában а zavara olvan fenotípusbeli változást eredményez a sejtekben, amely éhezés hatására szokott megjelenni (Barbet és mtsai, 1996; Weisman és mtsai, 2007). TORC1 a humán sejtekben is pozitívan hat a legtöbb ezen folyamatra, amely nagyfokú evolúciós konzervativizmusra utal (Wullschleger és mtsai, 2006).

A TORC1-el szemben a TORC2 funkciója kevésbé ismert. Ennek elsősorban az a magyarázata, hogy a két komplex közül a TORC1 az, amelynek az aktivitása rapamycinnel gátolható. Azonban elnyújtott idejű rapamycin kezelés a TORC2-ben is képes gátolni bizonyos folyamatokat (Lamming és mtsai, 2012; Sarbassov és mtsai, 2006). Általánosságban elmondható, hogy a TORC2 hatással van a sejtek metabolizmusára, szabályozza az aktin citoszkeleton újraszerveződést és a sejtprolifárációt (Soulard és mtsai, 2009; Zoncu és mtsai, 2011) (4. ábra).

2.6.3 A TOR proteineket szabályozó gének, szignálok

A fenti komplexek a TOR szignál útvonalban vesznek részt, mely számos sejtfolyamatot szabályoz. Így, központi szerepet töltenek be a például a sejtnövekedés szabályozásában élesztőkben és magasabb rendű eukarióta szervezetekben egyaránt. Ugyanis, minden élőlényre, legyen az egysejtű vagy többsejtű, jellemző egy bizonyos sejtméret, melyet a tápanyag elérhetősége, illetve növekedési faktorok befolyásolnak. Ezért annak érdekében, hogy a sejtek fenn tudják tartani a megfelelő méretüket, kifinomult, precíz sejtnövekedést szabályozó rendszerrel rendelkeznek (Montagne és mtsai, 1999; Wullschleger és mtsai, 2006).

Azaz, a TOR proteinek számos különböző szignált integrálnak annak érdekében, hogy a sejtek növekedését szabályozzák. Szabályozó szignálok

például a növekedési faktorok, a tápanyag-és energiaellátottság, illetve a környezeti stressz. Az egyik fő negatív regulátora a TOR proteineknek a TSC-TSC2 heterodimer, melynek mutációja a humán Tuberózus szklerózis szindróma kialakulásához vezet (Huang és Manning, 2008). A tuberózus szklerózis szindróma egy autoszómális domináns módon öröklődő betegség, amelyet testszerte megjelenő jóindulatú daganatok jellemeznek, az idegrendszert is érintő betegség (Astrinidis és Henske, 2005).

A TSC2 egy GTPáz aktiváló proteint (GAP) kódol és a TSC1-el együtt a GTP-t kötő Rheb nevű fehérjét inaktív GDP-t kötő formába alakítja át. Az így kialakult inaktív formája a Rheb fehérjének nem képes az emlős mTOR (mammalian TOR) fehérjéhez kötődni, vagyis nem képes aktiválni a TORC1-et (Long és mtsai, 2005) (4. ábra).



4.ábra Az mTOR szignál transzdukciós útvonal (Wullschleger és mtsai,

2006)

Az aminosav szignál szintén egy GTP-áz nevű fehérjén keresztül közvetítődik a TORC1 felé. A Rag nevű protein egy heterodimer, amely a TORC1-nek a citoplazmából a lizoszómák felszínére való áthelyeződését segíti elő. A lizoszómák felszínén a TORC1-et a Rheb nevű protein aktív állapotba helyezi (Sancak és mtsai, 2008). A TSC-mTOR szignál útvonalat számos jelentős tumor szupresszor is szabályozza, beleértve az LKB1-t (liver kinase B1) vagy a PTEN-t (Phosphatase and tensin homolog) illetve az onkogén AKT vagy más néven protein kináz b-t (PKB) (4. ábra). Ezeknek a géneknek a mutációja szintén hatással van a mTOR aktivitására, ezáltal a sejtek növekedésére, proliferációjára és metabolizmusára (Laplante és Sabatini, 2012; Martin és Hall, 2005). Tekintve, hogy a humán mTOR szignál útvonal szorosan egybefonódik az onkogén útvonallal, amely a tumor sejtek növekedését és sejtciklusát szabályozza, a TOR proteinek ideális célmolekulái a rákterápiának.

2.6.4 A TOR szignált közvetítő fehérjék és hatásaik

Az eddigi kutatási adatok szerint a TOR proteinek a különböző sejtfolyamatokra ható szignáljaikat a legtöbb esetben AGC kinázokon keresztül (protein kináz A/protein kináz B/protein kináz C) közvetítik (Jacinto és Lorberg, 2008) (5. ábra), melyek szerin-threonin családba tartozó fehérjék, s maguk is közvetlenül aktiválódnak foszforiláció útján.



5. ábra A TOR komplex és az AGC kinázok emberben (Jacinto és Lorberg, 2008)

Az emlős AGC kináz S6K az mTORC1 által foszforilálódik, illetve aktiválódik. Míg más emlős AGC kinázok, mint az AKT (protein kináz B), SGK (serum and glucocorticoid-regulated kinase 1) és PKC (protein kináz C) az mTORC2 target fehérjéi (5. ábra) (Laplante and Sabatini, 2009; Jacinto és Lorberg, 2008). Az AGC kinázokon kívül a TOR proteinek egyéb molekulákon keresztül is kifejthetik hatásukat, mint például a 4E-BP1 transzlációs faktoron keresztül (Jacinto és Lorberg, 2008) (4. ábra). Valamennyien fontos sejtfolyamatok szabályzói. Hiszen emlősökben az mTORC1 sejtnövekedésre és transzlációra hat, mely egyébként rapamycinnel gátolható (Hay és Sonenberg, 2004) (5. ábra).

Az mTOR a rapamycin rezisztens TORC2 tagja is lehet, s közvetlen foszforiláció útján aktiválja pl. az AKT AGC kinázt (Oh és mtsai, 2010; Sarbassov és mtsai, 2005), mely aktív formában különböző további target molekulákat foszforilál. Ezek aztán a sejtek növekedését, proliferációját, migrációját illetve a stresszre adott válaszát szabályozzák (5. ábra)(Jacinto és Lorberg, 2008; Oh és mtsai, 2010; Sarbassov és mtsai, 2005). Mindezek mellett a TOR szignál útvonalra jellemző az úgynevezett "feedback loop" vagy más néven visszacsatolási mechanizmus is. Ilyen mechanizmus figyelhető meg az AKT protein esetében, amely a mTORC2 target molekulája, s amely ugyancsak képes aktiválni mTORC1-et. Vagyis egyaránt szabályozója és effektora is a TOR proteineknek (Efeyan és Sabatini, 2010).

A PKC (protein kináz C) pedig a mTORC2 target molekulájaként szerepet játszik az apoptózis folyamatában, a sejtnövekedési ciklus, valamint a sejtalak és a sejtmotilitás szabályozásában (Nakashima, 2002). Éppen ezért a humán homológ mTOR rendellenes működése patológiás állapotokhoz vezethet, mint például a diabétesz, elhízás illetve neurodegeneratív betegségek (Laplante és Sabatini, 2012). A TOR kinázok aktivitásának megváltozása szintén kapcsolható az öregedéshez, mint természetes élettani folyamathoz, (Blagosklonny, 2006; Kapahi and Zid, 2004) illetve rákos folyamatok kialakulását is eredményezhetik (Bjornsti és Houghton, 2004; Chan, 2004).

2.7 A hasadó élesztő, mint a TOR útvonal tanulmányozására alkalmas modellszervezet

A TOR útvonallal kapcsolatos ismereteink az emlős sejtek tanulmányozása mellett, modellszervezeteken végzett kísérleteknek köszönhetők. A

Saccharomyces cerevisiae és Schizosaccharomyces pombe а két legintenzívebben tanulmányozott élesztő modell a TOR kutatást illetően. Az S. pombe több szempontból is kiválóan alkalmasnak bizonyul a TOR útvonal tanulmányozására. A két komplex struktúrája (TORC1 és TORC2) illetve a komplexeket felépítő proteinek konzervatívak (Wullschleger és mtsai, 2006; Jacinto és Lorberg, 2008). A TOR proteineket felülről a Rhb1 és Ryh1 kis GTPázok szabályozzák, amelyek a humán Rheb és Rab6 homológjai. A TOR proteinek aktivitásukat S. pombe-ben is AGC kinázok foszforilációján keresztűl fejtik ki (6. ábra). Psk1 a TORC1 target molekulája, míg Gad8 a TORC2 szabályozása alatt áll. Kiemelten alkalmassá teszi a hasadó élesztőt a TOR útvonal tanulmányozására az, hogy benne megtalálhatók az emlős TSC1/2 proteinek homológiai $(tsc1^+, tsc2^+)$ (6. ábra), míg például a S. cerevisiae modellszervezetben ezek a szabályozó elemek hiányoznak (Hall és Tamanoi, 2010). Ezáltal a S. pombe a tuberous szklerózis tanulmányozására is alkalmas modell szervezet. A magasabb rendű eukarióta szervezetekhez hasonlóan a hasadó élesztőben is a Tsc1-Tsc2 komplex a Rheb homológ, Rhb1 szabályozó molekulája, amely negatívan hat a Tor2 aktivitására (Urano és mtsai, 2007; Uritani és mtsai, 2006). A Rheb protein homológia S. cerevisiae-ben is megtalálható azonban nincs hatással a TOR proteinekre (Aspuria és mtsai, 2007). Mindezek mellett a TOR proteinek által szabályozott folyamatok is konzervatívak élesztők és az emlősök között, csakúgy, mint a sejtciklus, DNS károsodáskor aktiválódó folyamatok valamint a heterokromatin kialakulásának folyamata (6. ábra).



6. ábra TOR komplexek S. pombe-ban. Tor1 protein található TORC2-ben, míg TORC1 tartalmazza a Tor2 proteint. A TOR proteineket felülről szabályozó fehérjéket sárga szín jelöli, míg az TOR proteinek effektor AGC kinázait kék szín jelzi (Hall és Tamanoi, 2010)

2.7.1 S. pombe TOR komplex 1 (TORC1)

A hasadó élesztő két mTOR homológot tartalmaz, Tor1 és Tor2 (Weisman és mtsai, 2001) (6. ábra). A számozásuk a felfedezésük sorrendjében történt, míg a komplexeket, (TORC1 és TORC2) csak később fedezték fel. Ez alapján a Tor1 a TORC2 tagja, míg Tor2 a TORC1-ben található (Hayashi és mtsai, 2007; Ikai és mtsai, 2011; Matsuo és mtsai, 2007). A TORC1 tartalmazza a Tor2 fehérjét (Tor1 vagy Tor2 *S. cerevisiae*-ben; mTOR emlősökben) és a Mip1 proteint (Kog1 *S. cerevisiae*-ben, Raptor emlősökben). Továbbá találhatók még a komplexben olyan fehérjék is,

amelyek megegyeznek a két komplexben Wat1/Pop3 (Lst8 *S. cerevisiae*-ben; mLST8 emlősökben) (Alvarez és Moreno, 2006; Hayashi és mtsai, 2007; Matsuo és mtsai, 2007). Ezen kívül megtalálható még benne a Tti1 konzervatív eukarióta fehérje is, a Tel2 (Tel2 in *S. cerevisiae*-ben; hCLKS emlősökben) és Cka1 (Cka1 *S. cerevisiae*-ben; Ck1 emlősökben) (Hayashi és mtsai, 2007). A TOR komplexek felépítését az 5, 6 ábra szemlélteti.

A TORC1 nélkülözhetetlen átlagos körülmények mellett a hasadó élesztő sejtek számára és központi szerepet tölt be a növekedés szabályozásában és a nitrogén megvonásra adott optimális válasz kialakításában (Alvarez és Moreno, 2006; Matsuo és mtsai, 2007; Uritani és mtsai, 2006; Valbuena és Moreno, 2012; Weisman és mtsai, 2001; Weisman és mtsai, 2005; Weisman és mtsai, 2007; Otsubo és mtsai, 2014). Tor2 fehérje túltermelése meggátolja a szexuális differenciációt, a párosodást és a meiózist (Alvarez és Moreno, 2006). Míg a *tor2*⁺ gén deléciója a nitrogénre éhező sejtekhez hasonló fenotípust eredményez. Vagyis a sejtek megállítják a sejtciklusukat a G1 fázisban és kicsi, lekerekedett sejtekként térnek nyugalmi fázisba. Ilyenkor a nitrogénéhezésre adott optimális válasz kialakításához szükséges gének expressziója megemelkedik, míg a szexuális folyamatokhoz szükséges gének pedig kikapcsolt állapotban vannak (Alvarez és Moreno, 2006; Urano és mtsai, 2007; Weisman és mtsai, 2007).

2.7.2 S. pombe TOR komplex 2 (TORC2)

TORC2 tartalmazza a Tor1 proteint (Tor2 *S. cerevisiae*-ben, mTor emlősökben), Ste20 (Avo3 *S. cerevisiae*-ben, Rictor emlősökben) és a Sin1 alegységet (Avo1 *S. cerevisiae*-ben, mSin emlősökben) (Alvarez és Moreno, 2006; Hayashi és mtsai, 2007; Matsuo és mtsai, 2007) (6. ábra). Irodalmi adatok támasztják alá, hogy a TORC2 a Ryh1 és a kis Rab GTP-áz

szabályozása alatt áll, és a Sat1/Sat4 komplex, mint GEF (guanine-nucleotide exchange factor) viselkedik a Ryh protein számára (Tatebe és mtsai, 2010). A Torl nélkülözhető a sejtek növekedése szempontjából, azonban stressz körülmények között szükséges a sejtek túléléséhez, illetve a tápanyaghiányos feltételek mellett az optimális sejtválasz kialakításában (Weisman and Choder 2001). A TORC2 mutációja megnyúlt sejtmorfológiát eredményez, illetve a sejtek fokozottan érzékennyé válnak magas hőmérsékletre, oxidatív és ozmotikus stresszre. TORC2 hiányában a sejtek aminosav felvétele csökken, tápanyag hiányos feltételek mellett képtelenek szexuális ciklusba lépni. Ha pedig nyugalmi fázisba térnek, nem rendelkeznek a stacioner fázisban jellemző fiziológiával (Ikai és mtsai, 2011; Kawai és mtsai, 2001; Petersen és Nurse, 2007; Schonbrun és mtsai, 2009; Weisman és mtsai, 2001; Weisman és mtsai, 2005). Mindezek mellett, a TORC2 szükséges a telomer hosszának fenntartásához, s szerepet játszik a géncsendesítés folyamatában is (Schonbrun és mtsai, 2009), továbbá szükséges a DNS replikációja során keletkező stressz tolerálásában (Schonbrun és mtsai, 2013) (6. ábra).

A Gad8 protein kináz az egyetlen AGC kináz, amelyet a TORC2 effektoraként azonoítottak. A TORC2 a Gad8 fehérjén keresztül közvetíti a legtöbb, vagy talán az összes szignálját foszforiláció útján (Ikeda és mtsai, 2008; Matsuo és mtsai, 2003). Következésképpen, a $gad8^+$ deléciója a $\Delta tor1$ mutánsokhoz hasonló fenotípust eredményez (Ikeda és mtsai, 2008; Matsuo és mtsai, 2003; Schonbrun és mtsai, 2009).

S. pombe-ban a TORC1 és TORC2 ellentétes módon szabályozza az éhezés kiváltotta sejtválaszt, beleértve a szexuális differenciációt és a nitrogén éhezéskor szükséges gének expresszióját (Weisman és mtsai, 2007). TORC2 hiányában a sejtek úgy viselkednek, mintha <u>soha</u> nem éheznének nitrogénre. Vagyis a sejtek megtartják a megnyúlt sejtmorfológiát és sterilek.

Ezzel szemben, Tor2 (TORC1) hiányában a sejtek úgy tűnnek, mintha <u>mindig</u> nélkülöznék a nitrogénforrást. A sejtek megállítják a növekedésüket és a nitrogénre éhező sejtekhez hasonló morfológiával és fiziológiával rendelkeznek. Azaz, még nitrogén jelenlétében is szexuális ciklusba lépnek (YEA táptalaj) (Weisman és mtsai, 2007).

3. Anyagok és módszerek

3.1 A doktori munka során felhasznált törzsek

1. táblázat A felhasznált törzsek

A törzs száma	Genotípus	Származás
TA000	h ⁻ L972 vad típus	Tel Aviv University
TA001	h ⁺ L975 vad típus	Tel Aviv University
TA006	h ⁹⁰ vad típus	Tel Aviv University
TA657	h^{-} tor2-51:ura4 ⁺ ura4-D18	Álvarez és Moreno, 2006
TA947	h ⁻ isp7::kanMX6	Tel Aviv University
TA1719	h ⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 tor2-ts6	Matsuo és mtsai, 2007
TA1720	h ⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 tor2-ts10	Matsuo és mtsai, 2007
TA1845	h ⁻ tor2-51::ura4-D18 leu1-32	Tel Aviv University
2-998	h^+ <i>fhl1::ura4</i> ⁺ <i>ura4-D18</i>	Szilagyi és mtsai, 2005
2-1199	h ⁻ leu1-32	Tanszéki gyűjteményi
		törzs
2-1019	$h^{90} fhl1::ura4^+ ura4-D18$	Szilagyi és mtsai, 2005
2-1444	h ⁺ <i>fhl1::ura4</i> ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18</i>	Ebben a tanulmányban
		készített törzs
0-1	h ⁻ L972 <i>S. pombe</i> vad típusú törzs	Tanszéki gyűjteményi
		törzs
6-1	S. octosporus vad típusú törzs	Tanszéki gyűjteményi
		törzs
2-1199	h ⁻ <i>leu1-32</i>	Tanszéki gyűjteményi
		törzs
2-1422	h ⁻ rsv1::ura4 ⁺ , leu1-32, ura4-D18	Hao és mtsai, 1997
7-1	h ⁹⁰ S. <i>japonicus</i> vad típusú törzs	Tanszéki gyűjteményi
		törzs
-	Candida albicans vad típusú törzs	dr Emri Tamás,
		Debreceni Egyetem,
		Biotechnológiai és
		Mikrobiológiai Tanszék

3.2 A doktori munka során felhasznált plazmidok

Plasmid neve	Leírás	Forrás
pJET1.2/blunt	klónozó vektor	Thermo Scientific CloneJet TM
_		PCR cloning Kit K1231
pREP1	Magas fehérjeszintet biztosító	Maundrell 1993
	expressziós vektor, S. pombe	
	leucin markerrel	
pREP3X	Magas fehérjeszintet biztosító	Maundrell 1993
	expressziós vektor, S. pombe	
	leucin markerrel	
pREP41	Közepes fehérjeszintet	Maundrell 1993
	biztosító expressziós vektor, S.	
	pombe leucin markerrel	
pREP81	Alacsony fehérjeszintet	Maundrell 1993
	biztosító expressziós vektor, S.	
	pombe leucin markerrel	

2. táblázat Plazmidok

3.3 A doktori munka során felhasznált primerek

3. táblázat Primerek

Primer	primer szekvenciája	
törzskönyvi		Alkalmazás
száma és neve		
1138 mei2	5'-CACTAACTCGTAAACCATCTGTTACCGGA-3'	Northern blot
Forward		próba
1139 mei2	5'-GGATTAATTCCGTTCAGTAAATCACTATTCC-3'	Northern blot
Reverse		próba
7 ste11	5'-CCGACACAACTGTTTAGAAT-3'	Northern blot
Forward		próba
8 ste11	5'-AATTCCTACTTCTAATCACC-3'	Northern blot
Reverse		próba
1179 ste4	5'-ATGGGAGATTCTGACGATTTTTATTGG-3'	Northern blot
Forward		próba
1180 ste4	5'-CGAAATAGTTGAAGTGGCTTTACATCCATAG-3'	Northern blot
Reverse		próba

353 F (NdeI)F	5'-AAACCCCATATGATGAAAACGTACGAG- TGTCCC-3'	S. octosporus rsv1
354 R	5'-CCCCCGGATCCTTAATCGTTTTGAAACAACG-3'	S. octosporus
(BamHI)		rsv1
487 F (NdeI)	5'-CCCCATATGATGCCCGTATTTCTCCGCACG-3'	S. japonicus
		rsv1
488 R	5'-CCCGGATCCTCAGGTCGATGATTCCGCAG-3'	S. japonicus
(BamHI)		rsv1
646 F (NdeI)	5'-TTTCATATGATGGAGAATTATTTATTAAGT	C. albicans
	TCGCC-3'	Cas5
647 R	5'-TTTGGATCCTTAGGAAACTTCTTTGTTTTCATTC-	C. albicans
(BamHI)	3'	Cas5
570 F	5'-GCACTCGAGATGCCTGTTGCAGAG-3'	S.pombe fhl1
574 R	5'-GACGGATCCTCAGGTATAAGAGGATGATGTC-3'	S.pombe fhl1

3.4 Felhasznált tápközegek és oldatok

3.4.1 A hasadó élesztők tenyésztéséhez használt tápoldatok, táptalajok

4. táblázat Tápoldatok, táptalajok

Tápoldat	Összeté	tel	Felhasználás	
YEL (1000 ml) pH 5,2-5,4	glükóz	30,0 g		
(Sipiczki és	élesztő kivonat	5,0 g	Komplott tépoldot	
refericzy, 1977)	aminosav, nukleotid bázis kiegészítés (adenin, leucin, uracil, hisztidin)	100 mg	Komplett tapoldat	
YEA (Sipiczki és	YEL	100 ml	Komplett táptalaj	
Ferenczy, 1977)	poragar	20,0 g		
YPL (100 ml)	élesztőkivinat kazein pepton	1 g 1 g	Komplett tápoldat	
	glükóz	3 g		
YPA (100 ml)	YPL	100 ml	Komplett táptalaj	
	poragar	2 g		
	glükóz	20, 0 g		
	kálium-hidrogén-ftalát	3,0 g		
	NH ₄ Cl	5,0 g		
	Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	5, 55 g		
	Sóoldat	20 ml	1	
EMML (1000 ml)	Vitaminoldat	1 ml	1	
(Mitchison, 1970)	Nyomelemoldat	0,1 ml	Minimál tápoldat	
	aminosav, nukleotid bázis kiegészítés (adenin, leucin, uracil, hisztidin	100 mg		
EMMA (Mitchison,	EMML	100 ml		
1970)	poragar	20, 0 g	Minimál táptalaj	
EMMA+ tiamin	EMMA/EMML	1000 ml	Minimál tápoldat/ táptalaj	
	Tiamin (50 mg/l)	1 ml		
EMMA- nitrogén	EMMA/EMML NH ₄ Cl kihagyásával	1 99 0 ml	Minimál tápoldat/ táptalaj	
	EMMA/EMML	1000 ml		
Prolin táptalaj	prolin (NH ₄ Cl helyett)	10 mM	Minimál tápoldat/ táptalaj	

	KH ₂ PO ₄	1,0 g	
	glükóz	10 g	
	vitaminoldat	1 ml	
	Adenin, uracil, leucin,	20 mg	
SPAS (1000 ml)	hisztidin, arginin,		Spóráztató táptalaj
	triptofán		
	Desztillált víz	1000 ml	
	por agar	20 g	

3.4.2 Tápközegekhez szükséges oldatok összetétele

5. táblázat Tápközegekhez felhasznált oldatok

Oldat	Össze	etétel	Felhasználás
	pantoténsav	0,1 g	
1000x-es vitaminoldat	nikotinsav	0,1 g	EMML, EMMA,
(100 ml)	inozit	1 g	SPAS
	biotin	1 mg	
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	53,3 g	
50x-es sóoldat (1000	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,735 g	
ml)	KCl	50 g	EMMA, EMML
	Na_2SO_4	2 g	
	H ₃ BO ₃	5 g	
	MgSO ₄ x 4H ₂ O	4,47 g	
10 000 x-es	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	4 g	
nyomelemoldat (1000	FeCl ₃ x 3H ₂ O	2 g	
ml)	MoO ₄ x H ₂ O	1,6 g	EMMA, EMML
	KI	1 g	
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,4 g]
	citromsav	10 g	

3.4.3 Escherichia coli tenyésztéséhez használt tápoldatok

Oldat	Összetétel		
	bacto tripton	10 g	
LB+ampicillin pH7 (1000	élesztő kivonat	5 g	
ml)	NaCl	10 g	
	Ampicillin (50mg/ml)	1 ml	
LBA+ampicillin	LB+ampicillin	1000 ml	
	poragar	20 g	

6. táblázat Baktérium tenyésztéséhez felhasznált tápközegek

Alkalmazott kísérleti módszerek

3.5 Molekuláris biológiai módszerek

3.5.1 Genomiális DNS (gDNS) izolálása

S. pombe sejteket (10-15 ml) egy éjszakán át, 30°C-on YEL tápoldatban történő inkubálás után lecentrifugáltuk 4000 rpm-en 10 percig. A felülúszó eltávolítása után a sejteket desztillált vízzel átmostuk, 2 ml-es Eppendorf csőbe átvittük és újra lecentrifugáltuk (4000rpm 10 perc). A felülúszót leöntöttük és 0,2 ml lízis puffert (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH: 8,0, 1mM EDTA pH: 8,0), 0,2 ml fenol-kloroformizoamil alkoholt (Sigma P2069-400ML) és 0,3 g üveggyöngyöt (425-600 μm) (Sigma G8772-10G) mértünk a sejtekhez és 4 percen át vorex segítségével kevertük az elegyet. Ezt követően 0,2 ml 1XTE (10mM Tris-HCl, pH:8,0; 1mM EDTA) puffert mértünk az Eppendorf csövekbe és lecentrifugáltuk a sejteket (4000 rpm, 5 perc). A felső vizes fázist tiszta Eppendorf csőbe vittük át és 1ml abszolút etanolt adtunk hozzá. 20 percig - 20°C-on inkubáltuk a mintát, majd lecentrifugáltuk (12000rpm, 15 perc). A felülúszót eltávolítottuk és 70%-os etanolt adtunk a mintákhoz, majd újra lecentrifugáltuk (12000 rpm, 15 perc). Az üledékhez 400 µl 1XTE puffert és 3 µl RNáz oldatot mértünk és 37°C-on 15-20 percig inkubáltuk a mintákat. Az RNS eltávolítását követően 40 µl 3M nátrium-acetátot és 1 ml abszolút etanolt adtunk a mintához és 20 percen át -20°C-on tartottuk. A DNS kicsapását követően lecentrifugáltuk (12000 rpm, 15 perc), eltávolítottuk a felülúszót és lamináris fülke alatt megszárítottuk a mintákat. 20-50 µl 1XTE pufferben vettük fel a gDNS-t és -20°C-on tároltuk.

3.5.2 PCR reakció

A doktori munka során többféle PCR paramétert és enzimet használtunk. A reakcióhoz a Bio-Rad MyCyclerTM Thermal Cycler 170-9703 vagy az ABI 2720 Thermal Cycler készülékeket használtuk.

Az <u>*fhl1* gén felszaporításához</u> alkalmazott PCR paraméterek: 94°C 2 perc, 94°C 1 perc, 57°C 1 perc, 72°C 2.30 perc (30 ciklus), 72°C 10 perc, 15°C ∞

Az <u>S. octosporus rsv1</u> génjének felszaporításához alkalmazott PCR paraméterek: 94°C 2 perc, 94°C 1perc, 57°C 1 perc, 72°C 2 perc (30 ciklus), 72°C 10 perc, 15°C ∞

Az <u>S. japonicus rsv1</u> génjének felszaporításához alkalmazott PCR paraméterek: 94°C 2 perc, 94°C 1perc, 62°C 1 perc, 72°C 2.30 perc (30 ciklus), 72°C 10 perc, 15°C ∞

A <u>C. albicans Cas5</u> génjének felszaporításához alkalmazott PCR paraméterek: 94°C 2 perc, 94°C 1perc, 51°C 1 perc, 72°C 2.30 perc (30 ciklus), 72°C 10 perc, 15°C ∞

A <u>Northern blot próbák</u> (*mei2, ste11, ste4*) előállításához alkalmazott PCR paraméterek: 94°C 2 perc, 94°C 1 perc, 57°C 1 perc, 72°C 2 perc (35 ciklus), 72°C 10 perc, 15°C ∞

3.5.3 Agaróz gélelektroforézis

A DNS minták futtatását 1%-os agaróz gélen, TBE (Tris/Borate/EDTA) pufferben végeztük. A DNS mintákat 6x-os loading dye-al (Fermentas) festettük meg és méretüktől függően 30-50 percig futtattuk 120mV-on. A DNS-t a gélen Etídium-bromiddal (Sigma) tettük láthatóvá UV fénnyel megvilágítva. A futtatások során 1kb-os DNS markert (Thermo Scientific, SM0332) használtunk (7. ábra).

icauj to	bp ng/0.5	PQ %	2
1% TopVision [®] LE 6/J Agarose #fi0-491)	10000 18 8000 18 6000 18 5000 18 4000 18 3000 60 2000 16 1200 16 1200 16 1200 16 1200 16 1200 16 1200 17 500 17 500 17 500 17 500 17 500 17 500 20 100 20 100 20	0 36 0 36 0 36 0 36 0 38 0 38 0 32 0 34 0 34	

7. ábra. 1kb DNS marker
3.5.4 Élesztősejtek transzformálása elektroporátorral

A transzformálást a (Prentice, 1992) leírása szerint végeztük. Α transzformáláshoz a sejteket 100 ml tápfolyadékban tenyésztettük a hőmérsékleten 0.5×10^7 sejt/ml koncentráció eléréséig. A megfelelő tenyészetből lecentrifugáltunk 20 ml-t (3000 rpm, 5 perc), majd a sejteket 1 ml jéghideg 1,2 M-os szorbit oldattal átmostuk és újra lecentrifugáltuk a sejteket (3000 rpm, 5 perc). Ezt a lépést kétszer megismételtük. Ezt követően a sejteket annyi szorbit oldatban vettük fel, hogy a sejtkoncentráció 1×10^9 sejt/ml legyen. A sejtszuszpenzióhoz 1 µg plazmid DNS-t adtunk, illetve 2 µl 10mg/ml koncentrációjú hering spermából származó carrier DNS-t. Ezt a sejtszuszpenziót Bio-Rad küvettába átvittük és elvégeztük az elektroporálást a Bio-Rad Gene Pulser X-cell készülékkel a hasadó élesztőhöz ajánlott gyári paraméterek szerint: 2300 V; kapacitás 25 μF; ellenálás 100Ω. Ezt követően 1ml jéghideg 1M-os szorbitot adtunk a sejtekhez, majd a megfelelő kiegészítőkkel ellátott szelektív EMMA táptalajra szélesztettük és a megfelelő hőmérsékleten inkubáltuk a sejteket 4-8 napig, míg a transzformáns telepek meg nem jelentek.

3.5.5 Élesztősejtek transzformálása kémiai módszerrel

A sejteket 5 ml tápfolyadékban növesztettük egy éjszakán át a megfelelő hőmérsékleten. A sejteket lecentrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc), majd átmostuk 500 µl 1XTE-vel (pH 7,5 10mM TRIS, 10mM EDTA). Újra lecentrifugáltuk a sejteket (3000 rpm, 5 perc), majd 180 µl TE-ben (pH 7.5) felvettük a sejteket és 23 µl 1M-os pH 7.0 lítium-acetátot adtuk hozzá. Ezt követően hozzá adtuk a plazmid DNS-t (200 ng-1 µg) és 10 µl-t a 10 mg/ml-es koncentrációjú hering sperma carrier DNS-ből. Ezt követően 700 µl 50% PEG 4000 oldatot adtunk a sejtekhez és 30 percig 30°C-on inkubáltuk. Ezt követően 70 µl DMSO-t adtunk hozzá, majd 42°C 15 percig inkubáltuk a sejteket. A 42°-os hősokk-ot követően a sejteket 5 percre jégre helyeztük, majd lecentrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc). A sejteket steril desztillált vízzel átmostuk, majd 500 µl desztillált vízben felvettük őket és a megfelelő kiegészítőkkel ellátott EMMA szelektív táptalajra szélesztettük. A transzformáns telepek megjelenéséig (5-10 nap) az adott élesztő törzsnek megfelelő hőmérsékleten inkubáltuk a sejteket.

3.5.6 Baktérium transzformálás

A bakteriális transzformáláshoz minden esetben az *E. coli DH5* α kompetens sejteket használtuk (Shambrook és mtsai, 1989). A -70°C-on tárolt sejteket jégre helyeztük és hozzá adtuk a ligátumokat, majd 30 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően hősokkot alkalmaztunk, vagyis 42°C-on 2 percig inkubáltuk. Végül ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettük és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. Másnap néhány telepet izoláltunk a megjelent telepek közül.

3.5.7 Colony PCR

A colony PCR egy gyors diagnosztikai módszer. A kék-fehér szelekcióval szemben, ahol csak az inszert jelenlétéről kapunk információt, colony PCR-rel az inszert méretét is ellenőrizni tudjuk. A baktérium telepekből szuszpenziót készítünk úgy, hogy 20 µl vízbe fogpiszkáló segítségével kis mennyiségű baktériumot mosunk. A szuszpenziót 95°C-on 5 percig inkubáltuk, mely hőmérsékleten a baktériumsejtek felbomlanak, és a DNS kiszabadul. A sejtszuszpenzióból 2 µl-t adtunk a PCR reakcióhoz.

3.5.8 Restrikciós emésztés

Munkánk során többféle restrikciós enzimet alkalmaztunk. A reakció elegyeket a következőképpen állítottuk össze: Eppendorf csőben összemértünk 10 µl DNS-t, 4 µl 10x reakció puffert (Fermentas), 0,5 µl restrikciós enzimet (Fermentas) és 25,5 µl desztillált vizet. A reakció elegyet 37°C-on 1,5 órán át inkubáltuk.

3.5.9 Ligálás

A doktori munka során többféle ligálást végeztünk. A pJET 1.2/blunt klónozó vektorba való ligálásnál a kit (Thermo Scientific CloneJetTM PCR cloning Kit K1231) utasításait követtük. A vektor pozitív szelekciót tesz lehetővé az által, hogy csak az inzertet tartalmazó baktériumok tudnak telepet formálni. A klónozó helyet ugyanis egy olyan gén közepében alakították ki, melynek terméke letális a baktériumra nézve (8. ábra).



8.ábra A pJET1.2/blunt vektor térképe (<u>http://www.bioinfo.pte.hu/f2/pict_f2/pJETmap.pdf</u>)

Az expressziós vektorokba (pREP1/41/81) való ligálásokhoz mind az inszertet (PCR termék), mind pedig a vektorokat azonos restrikciós enzimmel emésztettük. A ligálásokat a következő reakció elegyben végeztük: 1 µl vektor (10 ng), 9 µl inszert (50 ng), 2 µl 10x T4 ligáz puffer (Promega), 1 µl T4 DNS ligáz enzim (Promega), 7 µl nukleáz-mentes víz. A ligálást egy éjszakán át 4°C-on végeztük. A ligátumot DH5 α kompetens sejtbe transzformáltuk a 3.5.6. fejezetben leírtak alapján.

<u>3.5.10 RNS izolálás</u>

Az RNS izolálást a Kaufer és mtsi, 1985. által leírt forró fenol módszerrel végeztük.

A sejteket 50 ml tápfolyadékban (EMMA vagy YEA) növesztettük 0,5-1x10⁷ sejt/ml eléréséig. A sejteket lecentrifugáltuk és a pelletet átmostuk 1 ml steril 0,9%-os NaCl oldattal. A sejtszuszpenziót átvittük Eppendorf csőbe és lecentrifugáltuk 13000 fordulatszámon, majd a felülúszót eltávolítottuk. (Ezen a ponton a sejtek eltárolhatók -80 °C-on felhasználig). A sejteket 100 µl STE oldatban (0,32M szukróz, 20mM TrisHCl-pH7,5, 10mM EDTA-pH 8,0) felszuszpendáltuk. Majd 200 mg üveggyöngy (425-600µm) (Sigma G8772-10G) hozzáadását követően néhányszor átkevertük vortex segítségével. 600 µl NTES (100mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM TrisHCl-pH 7,5, 1% SDS) oldatot adtunk az elegyhez és néhányszor vortexeltük. Ezt követően 500 µl 65 °C-ra előmelegített fenolt (Sigma #P4682) adtunk az elegyhez. Majd a fenollal együtt 5 percig 65°C-on inkubáltuk, közben néhányszor vortexel átkevertük. Lecentrifugáltuk 13 000 fordulatszámon 1 percig és a felső fázist a középső fehérje fázissal együtt átvittük egy következő 65°C-ra előmelegített 500 µl fenolt tartalamzó Eppendorf csőbe. 2

percig 65°C-on inkubáltuk és közben néhányszor vortexel átkevertük. 13 000 fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk és a felső valamint a középső fázist átvittük a következő 65°C-os 400 µl fenolt tartalmazó Eppendorf csőbe. 2 percig 65°C-on inkubáltuk, közben vortexeltük. 13000 fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk és ebben az esetben csak a felső fázist vittük át a fenol-kloroformot szobahőmérsékletű 400 μl tartalmazó következő Eppendorf csőbe. Vortexeltük és 13000 fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk. A felső fázist átvittük egy új Eppendorf csőbe és 300 µl kloroform oldatot adtunk hozzá. Vortex-el átkevertük és lecentrifugáltuk (13000 rpm 1 perc). A felső fázist új Eppendorf csőbe pipettáztuk és 1/10 térfogatnyi 3M-os Nátrium acetátot (pH 5,2) és 3 térfogatnyi abszolút etanolt adtunk hozzá. Vortexeltük és -20°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Másnap reggel 13 000 fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk. A pelletet 70%-os -20°C-os etanollal átmostuk (DEPC H2O-val higítva) és néhány percig vártunk, amíg az etanol elpárolog a csövekből. Az RNS pelletet 50 µl DEPC H2O-ban felszuszpendáltuk és -20°C-on tároltuk. Az így nyert RNS koncentrációját és minőségét spektrofotométerrel ellenőriztük (higítva 1:50 arányban. OD 260/280 arány). 1 µl-t futtatunk meg a mintából agaróz gélen és 20 µl-t futtatunk meg formaledehid gélen.

3.5.11 Formaledehid gél elektroforézis

0,75 g agarózt feloldottunk DEPC H₂O-ban (Biological Industries #01-852-1A) és 7,5 ml 10x-es MOPS (0,4 M MOPS pH 7,0, 0,1M Nátrium acetát és 0.01M EDTA) puffert adtunk hozzá és forrásig melegítettük. Az agaróz elegyet 60°C-ra lehűtöttük és 12,5 ml 37%-os formaldehidet adtunk hozzá, és azonnal kiöntöttük a géltartályba. Minták előkészítése: 20 µl pufferben lévő RNS mintát vittünk fel formaldehid gélre. Ebből 9 µl volt a puffer (1 µl MOPSx10, 1 µl Etídiumbromid (10mg/ml, Sigma), 2 µl formaldehid 37% és 5 µl formamid (Sigma)). Az RNS mennyisége 20 µg volt 11 µl-ben. Az RNS mintát a pufferrel együtt 65°C-on inkubáltuk 10 percig, ezt követően a formaldehid gél zsebeibe pipettáztuk. A futtató puffer 1x-es MOPS volt. 3 órán át 80V sebességgel futtattuk a mintákat.

3.5.12 Northern blot analízis

Az RNS gélről membránra való blottolása

Az RNS mintákat kapilláris módszerrel nylon membránra blottoltuk (Sigma#Z613762). A blottolást egy nagyméretű edényben végeztük. Az edénybe helyeztük a blottoló apparátust, hogy kiemeljük a pufferből. A blottoló apparátusra egy nagyobb méretű Whatman papírt helyeztünk, amely az edény egyik falától a másikig fut anélkül, hogy érintené az edény falát. A formaldehid gélt 3 réteg 3MM Whatman papírra helyeztük (Sigma) buborékmentesen. A Whatman papírt előzőleg átitattuk 20xSSC-vel (175,3 g NaCl, 88,2g Natrium citrát 11-ben, pH 7,0). A gélre helyeztük a nylon membránt, arra pedig 2 réteg SSC-vel átitatott 3MM Whatman papírt és 4cm-nyi száraz Whatman papírt helyeztünk. Az edénybe 600ml 20x-os SSC oldatot öntöttünk. A blottoló apparátust parafilmmel lefedtük és 500 g súlyt helyeztünk a tetejére. Sikeres transzfer esetén az RNS minta átkerült a gélről a membránra. A membránon az RNS-t UV keresztkötéssel (UV machine 1800, Strategene). rögzítettük.

Gén-specifikus próbák létrehozása

Genomiális DNS-ről PCR-rel 800-1000bp hosszú szakaszt szaporítottunk fel a gén ORF régiójából.

Radioaktív jelölés

A 800-1000 bp hosszúságú gén-specifikus próbákat $[\alpha^{-32}P]dCTP$ jelöltük (Random Primer Labeling Kit, Biological industries, #20-101-25).

Hibridizálás és mosás

A membránokat a próbák hozzáadását megelőzően, 30 percig 65°C-on előhibridizáltuk hibridizáló oldattal (15,6g NaH₂PO₄X2H₂O, 53,7 g Na₂HPO₄X12H₂O, 35 g SDS, 1 ml 0,5M EDTA pH 8.0). A prehibridizálást követően a denaturált próbát hozzáadtuk és egy éjszakán át 65°C-on inkubáltuk a membránt a próbával. Másnap reggel a membránt átmostuk 50 ml 0,1% SDS-t tartalmazó 2x-es SSC oldattal. 65°C-on 15 percig inkubáltuk. A következő mosási lépés 0,1% SDS-t tartalmazó 1x-es SSC oldattal történt. Ismét 65°C-on 15 percig inkubáltuk. A harmadik mosási lépést 50 ml 1x-es SSC-vel végeztük 65°C-on inkubáltuk 15 percig. A próbával jelölt membránokon autoradiográfiát végeztünk Fuji röntgen filmen -80°C-on. Ha a keresett RNS jelen volt a mintában, akkor az az autoradiogrammon a megfelelő helyen fekete sávként jelent meg.

A próba eltávolítása a membránról

Ha a membránt új próbával szeretnénk hibridizáltatni, az előzőleg hibridizált próbát el kell távolítanunk. A mosó puffer, amelyet erre a célra használtunk 20 mM Triss-HCl pH 8, 1mM EDTA, 1% SDS-t tartalmazott. Forrásig melegítettük a puffert és a membránhoz adtuk és 20-30 percig 65°C-on inkubáltuk. Geiger Müller mérőműszerrel ellenőriztük, hogy maradt-e a radioaktív anyag a membránokon.

3.5.13 cDNS átírás

A reverz transzkripciót az M-MLV (Promega) nevű transzkriptáz módszer leírása alapján végeztük. 1 µg RNS-t használtunk fel templátként, amelynek a koncentrációját nanodroppal meghatároztuk (Thermo Scientific NanoDropTM 1000 Spectrophotometer). Az RNS átírása két lépésben történt: Az RNS-t az oligo DT-vel (Promega) es RNáz-mentes vízzel 70°C-on inkubáltuk 3 percig, ezt követően jégre tettük 5 percre. Majd a reverz transzkriptáz puffer, DTT, dNTP mix és a reverz transzkriptáz enzim hozzáadását követően 42°C -on 60 percig inkubáltuk, majd 85°C-on denaturáltuk 10 percig. Az így átírt cDNSből 2 ul-t használtunk fel a szekvencia specifikus primerekkel való amplifikáláshoz.

3.6 Klasszikus módszerek

3.6.1 Törzsek keresztezése

A két egyesíteni kívánt, ellentétes párosodási típusú élesztőtörzset egy Eppendorf csőben 50 µl vízben összekevertük, majd spóráztató SPAS táptalajra 15 µl-t cseppentettük belőle. 25°C-on 2-3 napig inkubáltuk. A kialakult aszkuszokat 5-6 mg/ml koncentrációjú lysing enzim oldattal (Sigma) kezeltük a spórák kiszabadulásáig (5-6 órán át). A spórákat mikroszkóp alatt Bürker kamrában megszámoltuk és higítottuk úgy, hogy 150-200 spóra kerüljön egy szelektív táptalajt tartalmazó csészére.

3.6.2 Spórázási teszt

A homotallikus (h⁹⁰) *S. pombe* sejteket 25°C- on, a szükséges aminosavakkal kiegészített EMML tápfolyadékban növesztettük a logaritmikus fázis eléréséig. Majd minimál (EMML) és nitrogénmentes minimál (EMML-N) táptalajra cseppentettünk a sejtekből és 3 napon át 25°C-on inkubáltuk.

Mikroszkóp alatt vizsgáltuk a sejteket és a sporulációs képességet a következő képlet alkalmazásával határoztuk meg:

$$2x zigóta + 2x aszkusz + 1/2x spóra$$

Sporulációs képesség (%)=

1x vegetatív sejt+ 2x zigóta + 2x aszkusz + 1/2x spóra

3.6.3 Stressz-tolerancia vizsgálat

A sejteket komplett vagy minimál tápfolyadékban növesztettük 5×10^{6} sejt/ml sejtszám eléréséig. A sejtek számát spektrofotométerrel megmértük. OD₅₉₅ 0,2 sejtszámból kiindulva hígítási sort készítettünk majd 10 µl-t cseppentettünk az OD₅₉₅ 0,2, 10x-es, 100x-os és 1000x-es hígításokból a különböző sejtkárosító ágenseket tartalmazó YPA vagy EMMA táptalajokra.

3.6.4 Plazmidvesztéses kísérlet

Arra ad választ, hogy a minimál táptalajon felnövekvő telepek igazi transzformánsok (nem fertőzés eredményei), s valóban tartalmazzák az általunk bevitt plazmidot. Így a transzformánsokat a minimál (szelektív) táptalajról átcsíkoztuk nem szelektív komplett táptalajra (YEA vagy YPA), s egy éjszakán át inkubáltuk 30°C-on. Majd pedig minden csíkból kiszélesztettünk egy-egy kacsnyit komplett táptalajra, s inkubáltuk a Petri csészéket 3-4 napig 30°C-on. Az így kapott külön álló telepeket átreplikáztuk ismét minimál táptalajra és 2-4 napig 30°C-on inkubáltuk őket. Azok a telepek, amelyeknél egyaránt kaptunk minimál táptalajon nem növekvő (plazmidját vesztett) és növekvő (plazmidját megtartott) telepeket, azok valódi transzformánsok voltak. Ugyanis, a YEA vagy YPA tartalmazza a szükséges aminosavat vagy nukleotid bázist, így a sejteknek nincs feltétlenül

szüksége a szelekciós markert biztosító plazmidjára, s ilyen körülmények között a sejtek egy része elveszítheti a plazmidját. Azonban a minimál táptalajra visszakerülve, ezek a sejtek már nem tudnak nőni és telepet képezni, hiszen nem rendelkeznek a szelekciós markert biztosító plazmiddal.

3.6.5 Mikroszkópos vizsgálatok

A mikroszkópos méréseket (sejtek számának meghatározása, sejtek morfológiájának megfigyelése) az Olympus BX40 fénymikroszkóppal végeztük.

3.6.6 Bioinformatikai módszerek

Az oligonukleotid primerek tervezését a SnapGene illetve a vectorNTI nevű programok segítségével végeztük. A Schizosaccharomyces fajok adatait a PomBase (https://www.pombase.org/), illetve Broad а Institute (https://www.broadinstitute.org/) oldalon kerestük meg. A Candida albicans adatait pedig a Candida Genome Database (<u>http://www.candidagenome.org/</u>) oldalról töltöttük le. A nukleotid és fehérjeszekvenciák összehasonlítását a NCBI Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) opciója segítségével végeztük. fajok közötti összehasonlítást Clustal А а Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) programmal végeztük.

Az S. pombe ∆fhl1 gén target génjeit a PomBase oldalon meghatározott GO kategóriák alapján azonosítottuk. A S. pombe rsv1 gén illetve homológjainak, protein szekvenciáinak analízisét az UniProt (<u>http://www.uniprot.org/</u>), illetve a WebLogo3 (<u>http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi</u>) programokkal végeztük.

3.6.7 Génexpressziós vizsgálatok

A mikroarray adatokat az UD-GenoMed szolgáltatta. A 3-3 párhuzamosan tenyésztett $\Delta fhl1$ és vad típusú sejtekből RNS-t izoláltunk, majd az RNS mintákat Qiagen RNeasy mini oszlopok segítségével kitisztítottuk (Qiagen cat. no.

74104). Az RNS minták ellenőrzése Agilent BioAnalyzer RNS Nano lab-on chip-en történt. A teljes génexpressziós mintázat analízise Affimetrix chipeken történt (Affymetrix GeneChip Yeast 2.0 arrays). Minden mintából 200 ng RNS került amplifikálásra és jelölésre. A microarray-re történő amplifikálási és jelölési folyamatra felhasznált reagensek: 3' IVT Express Kit (Affymetrix) 901228 GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix) 900720 (30Rxn) 100 % etanol (ACS reagent grade).

A mikroarray adatok analízise a GeneSpring 13.0 GX szoftverrel történt (Agilent Technologies). Az elemzés menete: 1. CEL fájlok importálása – RMA (robust multichip analysis) normalizálás és medián normalizálás.

2. Elemzés: Az expresszálódott gének meghatározása a legalacsonyabb értéket mutató gének 20%-ának kiszűrésével történt. Ezt követően a minimum 1,5-szeres változást mutató gének meghatározása a $\Delta fhl1$ és vad típusú minták között. A megváltozott expressziós szintet mutató gének statisztikai elemzése t-próbával történt, mely adatok korrekciója a Benjamin-Hochberg False Discovery Rate alkalmazásával történt.

47

4.Eredmények

4.1 Az fhl1 gén vizsgálata

A munkánk egyik célja az volt, hogy a Sep10 mediátor alegység által szabályozott szignáltranszdukciós útvonalak *fhl1* gén által regulált részét felderítsük, az *fhl1* target gének azonosítása révén. Célunk volt továbbá, az *fhl1* más génekkel, útvonalakkal való kapcsolatának kiderítése is.

4.1.1 A *∆fhl1* által szabályozott gének azonosítása

Annak érdekében, hogy kiderítsük mely gének expresszióját szabályozza az *fhl1* gén által kódolt transzkripciós faktor, mikroarray analízist végeztünk. Azaz, a mutáns *fhl1* és vad típusú sejteket minimál (EMML) és komplett (YEL) tápfolyadékban szaporítottuk logaritmikus fázis (0,5-1 x10⁷ sejt/ml) eléréséig. Három-három tenyészetből RNS-t izoláltunk a mindkét típusú tápfolyadékban növesztett sejtekből. Majd pedig az RNS minták felhasználásával a génexpressziós vizsgálatokat elvégeztettük. Az 9. a,b ábra a target géneknek klaszterekbe rendezett hierarchikus analízisét mutatja. Azon géneket jelöli, amelyeknek az expressziója minimum 1,5-szeres változást mutatott a kontroll (vad típusú) csoporthoz képest. Minimál (EMML) tápközegben 72 gén expressziója változott az *fhl1* mutánsban, melyek közül 38 gén expressziója csökkent, 34 gén expressziója emelkedett a vad típusú sejtekhez képest. Komplett (YEL) tápközegben 75 gén expressziós szintje változott, 49 gén expressziója nőtt, míg 26 géné csökkent (9.c ábra).



9. ábra Az Δfhl1 törzs mikroarray analízisével kapott hierarchikus génklaszterek (A, B). Gének, amelyeknek az expressziója nőtt (+) vagy csökkent (-) az fhl1 mutánsban EMML-ben (A ábra) vagy YEL-ben tenyésztve (B ábra). A módosult mRNS szintet mutató gének száma (C ábra).(I.II.III. a kísérletek száma)

Az első megfigyelésünk a target géneket illetően az volt (Függelék, 1. és 2. táblázat), hogy a két különböző tápközegben módosult transzkripciót mutató gének csak részben egyeznek meg. Az átfedő, azaz mindkét táptalajban (komplett és minimál) módosult transzkripciót mutató géneket a 7. táblázatban foglaltuk össze. Azonban a további vizsgálatok kiderítették, hogy a különböző gének is többnyire azonos GO (Gene Ontology) kategóriákba sorolhatók, vagyis funkciójuk szerint hasonlóak. Az *fhl1* mutánsban megváltozott gének teljes listája és a GO kategóriák, a függelék 1-es és 2-es számú táblázatában találhatók.

7. táblázat Azon géneket listája, melyeknek az expressziós szintje mindkét tápközegben megváltozott az *fhl1* mutánsban

	Funkció	mRNS szint az <i>fhl1∆</i>
Gén azonosítója/		törzsben
Gén neve		YEL vagy EMML
mei2	meiózisban fontos RNS-kötő fehérje	+
ste4	adaptor fehérje	+*
stell	transzkripciós faktor	+
vps32	ESCRT III komplex alegység	+
mfc1	membrán transzporter	+
dak2	dihidroxi aceton kináz	+
SPAC186.02c	hidroxi sav dehidrogenáz	+
ura4	orotidin 5'-foszfát dekarboxiláz	-
rpl1603	60S ribozómális fehérje L16	-
vht1	H- vitamin transzporter	-
mug150	árva gén 50	-

	GDT1-szerű fehérje	-
SPAC186.05c		
	hipotetikus fehérje	-
SPAC1142.09		
	2-dehidropantoát 2-reduktáz	-
SPBPB2B2.09c		
	N-acetil transzferáz	-
SPBC1271.07c		
	arilszulfatáz	-
SPBPB10D8.02c		
	cisztein transzporter	-
SPCPB1C11.03		
	kromatin csendesítő fehérje	-
clr2		

*(a *ste4* gén expressziós szintje 1,46-szeres emelkedést mutatott a vad típusú sejtekhez képest). (+) mRNS szint növekedett, (-) mRNS szint csökkent.

4.1.2 Az *fhl1* által szabályzott gének funkciójának megállapítása felfedte, hogy az *fhl1* szabályozza a nitrogén éhezésre indukálódó géneket

Azon géneket, amelyeknek az expressziója minimum 1,5-szeresére változott az *fhl1* mutánsban, a PomBase adatbázisban található GO kategóriák alapján azonosítottuk (Függelék 1. 2 táblázat). Ezeket megvizsgálva feltűnő volt, hogy funkciójuk szerint a gének jelentős része a nitrogén éhezéskor indukálódó gének csoportjába volt sorolható.

Mivel Mata és mtsai, 2002-ben publikált cikke is a **nitrogénéhezés** indukálta gének expressziójával foglalkozik, adatainkat összevetettük e cikk adataival. A tanulmány szerint ezek a gének három csoportba sorolhatók. 1) Késői géneknek nevezték el azon gének csoportját, amelyek a nitrogén forrás megvonásától számított egy óra múlva indukálódtak. 2) Átmenetileg indukálódnak azok a gének, amelyeknek az expressziós szintje a nitrogén megvonást követő egy órán belül megemelkedik és két-három órán át magas marad. 3) Folyamatosan indukálódók azok a gének, amelyeknek az expressziós szintje a nitrogén megvonással egy időben megemelkedik és a kísérlet során végig magas marad. Ezen információt is figyelembe véve megvizsgáltuk az *fhl1* mutánsban megváltozott expressziós szintet mutató nitrogénéhezés indukálta géneket, s a gének többsége a késői és az átmenetileg indukálódó gének kategóriájába tartozott (8. 12. táblázat).

4.1.3 Az *fhl1* szabályozása alatt állnak a párosodás és a sporuláció folyamatában fontos gének

A részletesebb vizsgálatok után kiderült, hogy a nitrogénéhezés hatására expresszálódó gének között nagy számmal találunk a párosodás és a sporuláció folyamatában fontos géneket (8. táblázat). Ilyen például a $mei2^+$, $ste4^+$, $mfm1^+$, $mfm2^+$, $matMc^+$. Ezek a gének a $ste11^+$ transzkripciós faktor szabályozása alatt állnak (Sugimuto és mtsai, 1991), amely megemelkedett expressziós szintet mutatott mindkét mikroarray analízis során. A $mei2^+$, amely fontos regulátora a meiózisnak, szintén megemelkedett expressziós szintet mutatott az *fhl1* mutánsban a mikroarray kísérletben (Függelék, 1. és 2. táblázat). Ezt az eredményt Northern blot kísérlettel is megerősítettük (10. ábra).

8. táblázat Az *fhl1* gén szabályozása alatt álló sporulációban fontos gének listája

Gén	Gén	Leírás	mRNS szint a <i>∆fhl1</i> mutánsban		Expressziós profil -N
azonositoja	neve		LIVIIVIL	ILL	enavontasa utan
SPBC29B5.02c	isp4	szexuális		-	folyamatos
		differenciáció			-
SPAPB8E5.05	mfm1	M-faktor		-	késői
	Ť	prekurzor 1			
SPAC513.03	mfm2	M-faktor		-	késői
	Ť	prekurzor 2			
SPBC1711.02	mat-Mc	mating-type M-		-	késői
		specifikus			

		polipeptid Mc			
SPAC1565.04c	ste4	adaptor protein	+*	+	késői
SPBC32C12.02	stell	transzkripciós	+	+	késői
		faktor			
SPAC11E3.06	map1	MADS-box		+	késői
		transzkripciós			
		faktor			
SPAC3F10.10c	тар3	Feromon M-		+	késői
		faktor receptor			
SPAC27D7.03c	mei2	meiózisban fontos	+	+	késői
		RNS-kötő protein			
SPAC13A11.03	тср7	meiózis specifikus	+		
	_	protein			

*(a *ste4* gén expressziós szintje 1,46-szeres emelkedést mutatott a vad típusú sejtekhez képest). (+) mRNS szint növekedett, (-) mRNS szint csökkent.



10. ábra Az *fhl1*⁺ transzkripciós faktor, a *mei2*⁺ gén negatív regulátora. A *mei2*⁺ gén expressziós szintje megemelkedett az Δ*fhl1* törzsben a vad típusú törzshöz képest. Δ*isp7* törzset pozitív kontrollként használtuk a Northern hibridizációs kísérletben (Laor és mtsai, 2014).

A mikroarray adatok és a Northern blot kísérleti eredményekre alapozva, jó okunk volt feltételezni, hogy az *fhl1* transzkripciós faktor szerepet játszhat a meiózis és spórázás folyamatokban. Annak érdekében, hogy további bizonyítékot gyűjtsünk ennek a kérdésnek a megválaszolására, meghatároztuk a $\Delta fhl1$ gén spórázó képességét. Vad típusú és $\Delta fhl1$ homotallikus (h⁹⁰) törzseket logaritmikus fázis eléréséig növesztettük, majd minimál (EMMA), nitrogénmentes minimál (EMMA-N) és prolin-tartalmú táptalajra cseppentettünk a sejtekből. A telepek megjelenését követően a 3.6.2. fejezetben leírtak alapján meghatároztuk a törzsek spórázási képességét. A 9. táblázat adataiból látszik, hogy az *fhl1* gén deléciója következtében magasabb a sejtek spóraképzése a vad típusú sejtekhez képest mind nitrogénmentes minimál, mind pedig prolin-tartalmú táptalajokon.

9. táblázat Az *fhl1* deléciója következtében megemelkedik a sejtek spóraképző képessége

Spórázási képesség (%)					
Törzs	Táptalajok				
	EMMA	EMMA-N	Prolin tartalmú EMMA		
TA06					
vad típusú h ⁹⁰	67±3	$65 \pm 2,6$	$71\pm 2,5$		
2-1019					
$\varDelta \mathit{fhl1}\ \mathrm{h}^{90}$	$65 \pm 3,6$	81± 1,73	82± 1,5		

4.1.4 Átfedés az fhl1 és a tor2 által szabályozott gének között

Tekintve, hogy hasadó élesztőben a nitrogénhiány következtében kialakuló sejtválasz egyik központi regulátora a *tor2* gén, összehasonlítottuk a $\Delta fhl1$ gén génexpressziós adatait a *tor2* mutáns mikroarray analízisével is (Matsuo és mtsai, 2007). A 10. táblázatban összefoglaltuk azon géneket, amelyek mind a *tor2* mutánsban, mind pedig az *fhl1* mutánsban eltérő expressziós szintet mutattak a vad típusú sejtekhez képest.

10. táblázat Az fhl1 és a tor2 -függő transzkripciót mutató gének listája

Gén azonosítója	Gén neve	Leírás	∆ fhl1	tor2-ts6*
SPAC2E1P3.05c		gomba cellulóz-kötő domén	+	+
SPAC11E3.06	map1	MADS-box transzkripciós faktor	+	+
SPAC1565.04c	ste4	M-faktor prekurzor	+	+
SPAC3F10.10c	map3	feromon M-factor receptor	+	+
SPAC27D7.03c	mei2	RNS-kötő protein	+	+
SPAC1039.02		kalcineurin-foszfodiészteráz	-	+
SPAC13G7.13c	msa1	sporulációban fontos (predicted)	-	+
SPBC29B5.02c	isp4	OPT oligopeptid transzporter család tagja	-	+
SPAC1039.01		aminosav permeáz család tagja	-	+
SPAC513.04		árva gén	-	+
SPAC513.03	mfm2	M-faktor prekurzor	-	+
SPAC3H1.06c		membrán transzporter (predicted)	-	+
SPBC1711.02	matMc	mating-type m-specifikus polipeptid	-	+
SPCC285.05		purin nukleozid transzporter (predicted)	-	+
SPCC1223.09		urikáz enzim (predicted)	-	+
SPAPB8E5.05	mfm1	M-faktor prekurzor	-	+
SPBPB2B2.01		aminosav permeáz család tagja	-	+
SPAC1142.09		funkciója bizonytalan	-	+
SPCC132.04c		glutamát dehidrogenáz	-	+

* Matsuo és mtsai, 2007, (+) mRNS szint növekedett, (-) mRNS szint csökkent.

4.1.5 Az *fhl1* gén túltermelése csökkenti a *tor2-ts* sejtek hőmérséklet- és rapamycin érzékenységét

Irodalmi adatok szerint *S. cerevisiae*-ben az Fhl1 gén a TORC1 szabályozása alatt áll (Martin és mtsai, 2004). Mivel a mikroarray vizsgálat adatait összevetve mi is találtunk hasonlóságot a két gén funkcióját illetően, szerettük volna tovább vizsgálni az *fhl1* gén és a TOR útvonal kapcsolatát. Ennek érdekében megvizsgáltuk az *fhl1* gén túltermelésének a hatását a *tor2ts* sejtekben. Azaz, az *fhl1* gént egy magas expressziós szintet biztosító túltermelő vektorba klónoztuk (pREP3x), majd pedig *tor2-ts* mutáns sejtekbe transzformáltuk. A 11. ábrán látható, hogy az *fhl1*⁺ gén túltermelése csökkentette a *tor2-ts* mutáns sejtek rapamycin érzékenységét mindhárom allél esetében (*tor2-ts10, tor2-ts6, tor2-51*). Azonban a hőmérséklet érzékenység csökkentésében eltérést tapasztaltunk az *fhl1*⁺ aktivitását illetően, a három különböző *tor2-ts* allél esetében. A pREP3x*-fhl1*⁺ konstrukcióval transzformált három *tor2-ts* allél közül csak *tor2-ts10* sejtek voltak képesek nőni restriktív hőmérsékleten.



11. ábra Az *fhl1*⁺ gén túltermelése csökkenti a *tor2-ts* sejtek hőmérséklet- és rapamycin érzékenységét. A *tor2-ts* hőmérséklet érzékeny mutáció eltérő alléljait hordozó *tor2-ts* sejteket (A:*tor2-51*; B:*tor2-ts6*; C:*tor2-ts10*) pREP3x üres vektorral, pREP3x-*fhl1*⁺, vagy pREP3x-*tor2*⁺ -vel transzformáltuk. Cseppek sorrendje: OD₅₉₅0,2, 10x, 100x, 1000x hígítás (balról jobbra)

Annak érdekében, hogy további információt szerezzünk az *fhl1* gén és a TOR útvonal kapcsolatát illetően, megvizsgáltuk az *fhl1*⁺ génnel transzformált *tor2-ts* mutáns sejtek spórázási képességét is. Ugyanis a *tor2* mutáns sejteknek sajátsága, hogy még komplett táptalajon is úgy viselkednek, mintha nitrogénre éheznének. Vagyis képesek szexuális ciklusba lépni és spórákat képezni. Ezért megvizsgáltuk, hogy az *fhl1*⁺ gén túltermelése képese elnyomni a *tor2-ts* sejteknek ezt a hipersporulációs képességét. Üres pREP3x vektorral és pREP3x*-fhl1*⁺ konstrukcióval transzformált homotallikus (h⁹⁰) *tor2-ts* sejteket logaritmikus fázisig növesztettünk, majd minimál (EMMA) és nitrogén-mentes minimál (EMMA-N) táptalajra cseppentettük. A spórázási képességet a 6.3.2. fejezetben leírtak alapján határoztuk meg. A kísérlet eredményét a 11. táblázatban foglaltuk össze. Az *fhl1*⁺ gén túltermelése mintegy 22%-kal csökkentette a *tor2-ts10* sejtek túlzott spóraképzését minimál és nitrogén-mentes minimál táptalajon is.

11. táblázat Az *fhl1*⁺ gén túltermelése csökkenti a *tor2-ts10* mutáns sejtek túlzott spóraképzését

Spórázási képesség (%)					
Törzs genotípusa	EMMA	EMMA-N			
<i>tor2-ts10</i> + pREP3X vektor	83±3	89± 2,5			
tor2-ts10+ pREP3X-fhl1 ⁺	61±2	67±2			

A *tor2-ts* mutáns sejtek "hyper-mater" fenotípusa mögött, a nitrogén éhezéskor indukálódó, meiózisban fontos gének (*ste11*⁺, *mei2*⁺, *ste4*⁺) megemelkedett expressziós szintje áll (Matsuo és mtsai, 2007). Ezért Northern blot kísérlettel megnéztük, hogy ezeknek a géneknek az expressziója hogyan változik az *fhl1*⁺ gén túltermelésének következtében. Az *fhl1*⁺ gén túltermelésének a *tor2-ts* sejtek spóraképzésére gyakorolt hatásával összhangban, az *fhl1*⁺ túltermelése csökkentette a meiózisban szerepet játszó *ste11*⁺, *mei2*⁺ és *ste4*⁺ gének expresszióját is a *tor2-ts* mutáns sejtekben (12. ábra).





12. ábra Az *fhl1*⁺gén túltermelése csökkenti a nitrogénéhezés indukálta gének expresszióját a *tor2-ts* sejtekben. Northern blot analízis. A vad típusú (wt) és *tor2-ts* üres vektorral transzformált (pREP3X) és a pREP3X-*fhl1*⁺ konstrukcióval transzformált sejteket 25°C-on növesztettük a logaritmikus fázis eléréséig minimál (*nmt1*⁺ promóter aktív) vagy tiamin tartalmú minimál táptalajon (*nmt1*⁺ promóter inaktív). Majd 33°C-on 4 órán át inkubáltuk a sejtek RNS izolálást megelőzően. *ste11*⁺, *mei2*⁺ és *ste4*⁺ próbákkal hibridizáltattuk az RNS mintákat.

4.1.6 Az *fhl1*⁺gén túltermelése nincs hatással a *∆tor1* sejtek hőmérséklet érzékenységére

A TORC1 és TORC2 jónéhány sejtválaszt, többek között a nitrogénéhezés által kiváltott szignál útvonalat ellentétes módon szabályozza. Míg a TORC1 pozitívan hat a nitrogén éhezéskor indukálódó gének expressziójára, addig a TORC2 negatívan befolyásolja azok expresszióját. Azonban figyelembe véve az irodalmi adatokat, miszerint a két komplex bizonyos sejtfolyamatokat együttműködve szabályoz (Martin és mtsai, 2017), így fontosnak láttuk tisztázni az fhl1-nek a TORC2-vel való lehetséges kapcsolatát is. Első lépésben a *Afhl1* gén mikroarray adatait a TORC2 katalitikus alegységének a mikroarray adataival is összevetettük. Ebben az esetben csak néhány olyan gén azonosítottunk, amely mind az *fhl1*, mind pedig a *tor1* mutánsban megváltozott expressziós szintet mutatott (Schonbrun és mtsai, 2009). Ezek között találunk fehérjéket transzporter kódolót (SPAC186.05c, SPCPB1C11.03, vht1, SPCC285.05), hidroláz aktivitású enzimet kódolót (SPAC977.15), membránkomponens (wtf5), RNS-kötő fehérjét (cwf2), enzim aktivitású (SPBPB8B6.05c), és chaperon aktivátort (stil). A következőkben kísérletesen is megvizsgáltuk, hogy az *fhl1* gén kapcsolatban áll-e TORC2vel. Azaz, a pREP3X-*fhl1*⁺ konstrukciót betranszformáltuk a $\Delta tor1$ sejtekbe és megvizsgáltuk a transzformánsokat rapamycin jelenlétében valamint alacsony és magas hőmérsékleten. A 13. ábrán látható, hogy az *fhl1*⁺ gén túltermelése nem csökkentette szignifikánsan a *Ator1* sejtek rapamycin érzékenységét, illetve nem volt hatással a hőtoleranciájára sem. Mindez azonban még nem jelenti feltétlenül azt, hogy az fhl1 és a tor1 között kizárható a kapcsolat. De ezt csak további fenotípusos jegyek vizsgálatával tudjuk majd a jövőben egyértelműen eldönteni.



13. ábra Az *fhl1*⁺ gén túltermelése *∆tor1* mutáns sejtekben EMMA és
 EMMA+rapamycin (*) táptalajon. Cseppek sorrendje: OD₅₉₅ 0,2, 10x, 100x, 1000x hígítás (balról jobbra)

4.1.7 Az fhl1 feltehetően szabályozza a transzporfolyamatok egy részét is

A nitrogénéhezés következtében indukálódó gének között jó néhány **transzporter gént** is találtunk. Minimál táközegben a 72 target gén közül 14, míg komplett tápközegben a 75 target gén közül 10 gén sorolható a transzportfolyamatokban szerepet játszó gének csoportjába (12. táblázat).

12. táblázat Az *fhl1* gén szabályozása alatt álló transzporter gének listája

Gén	Gén Leírás neve		én Leírás Δfhl1 mut		Expressziós szint a nitrogén
azonositoja	neve		EMML	YEL	eltávolítása után
SPAC1B3.16c	vht1	H- vitamin transzporter	-		változatlan
SPCPB1C11.03		Cisztein transzporter	-	-	változatlan
SPBPB10D8.01		Cisztein transzporter	-		változatlan
SPAC869.05c		Szulfát transzporter	-		változatlan
SPAC1F8.03c	str3	sziderofór- vas transzporter	-		változatlan

SPBC530.02		Membrán transzporter	-		változatlan
SPBC359.05	abc3	ABC transzmembrán transzporter	-		változatlan
SPAC1039.01		gamma-amino vajsav /poliamin	+	-	átmeneti
		transzporter			
SPAC750.02c		Membrán transzporter	+		változatlan
SPAC869.03c		Urea transzporter	+		átmeneti
SPBC13A2.04c		PTR család peptid transzporter	+		változatlan
SPAPB1A11.01	mfc1	Membrán transzporter	+	+	változatlan
SPAP7G5.06	perl	Aminosav permeáz	+		változatlan
SPBPB2B2.01		Aminosav permeáz	+	-	átmeneti
SPCC285.05		Purin nukleozid transzporter		-	átmeneti
SPAC3H1.06c		Membrán transzporter		-	átmeneti
SPBC29B5.02c	isp4	OPT oligopeptid transzmembrán		-	változatlan
		transzporter család tagja			
SPBC359.03c	aat1	Aminosav transzmembrán		-	változatlan
		transzporter			
SPCC576.17c		piridoxamin/piridoxin/piridoxál		+	változatlan
		transzmembrán transzporter			
SPCC1020.10	oca2	szerin/treonin protein kináz		+	változatlan

(+) mRNS szint növekedett, (-) mRNS szint csökkent

4.1.8 Az *fhl1* transzkripciós faktor által szabályozott géneknek csak egy része tartozik Sep10 szabályozása alá

Az $\Delta fhl1$ törzzsel végzett génexpressziós kísérleteink eredményeit összevetettük a korábbi *sep10* mutáns törzzsel végzett kísérleteinkkel is azzal a céllal, hogy felderítsük a *sep10* target gének azon csoportját, amelyek feltehetően csak az *fhl1* gén módosult mRNS szintje miatt mutattak magasabb vagy alacsonyabb génexpressziót (Miklos és mtsai, 2008). E gének csoportját, a 13. táblázat mutatja be. Az összehasonlítás arra is rávilágított, hogy az *fhl1* target géneknek csak egy csoportja tartozik a Sep10 regulációja alá.

Gén azonosítója			∆ fhl1		sep10
	Gén	Leírás	YEL	EMML	
	neve				
SPAC1B3.16c	vht1	vitamin H transzporter	-	-	-
SPCPB1C11.03		cisztein transzporter	-	-	-
SPAC513.04		árva gén	-		-
SPAC3H1.06c		membrán transzporter	-		-
SPBC1271.07c		N- acetil transzferáz	-		-
SPAPJ760.03c	adg1	árva gén/glikoprotein	-		-
SPBC29B5.02c	isp4	oligopeptid transzporter	-		-
SPBC359.03c		aminosav permeáz	-		-
SPAC2E1P3.05c		cellulózkötő fehérje	+		-
SPBPB7E8.01		árva gén	-		-
SPAC1142.08	fhl1	fork head típusú	-		-
		transzkripciós faktor			
SPAC13G7.13c	msa1	RNS kötő fehérje	-		-
SPAPB8E5.05	mfm1	M-faktor prekurzor	-		-
SPCC1223.09		urikáz	-		-
SPCC965.14c		citozin deamináz	-		-
SPAC27D7.03c	mei2	meiózisban fontos RNS	+	+	-
		kötő fehérje			
SPAC977.16c	dak2	dihidroxi aceton kináz	+	+	-
SPCC132.04c		NAD- függő glutamát	-		-
		dehidrogenáz			
SPAC750.05c		hipotetikus fehérje		-	+
SPBPB2B2.08		konzervatív gomba		-	+
		fehérje			
SPCC569.07		aminotranszferáz		-	-
SPBC13A2.04c		peptid transzporter		+	-
SPBC1861.02	abp2	ARS kötő protein		+	+
SPAPB24D3.07c		árva gén		+	+
SPAC869.01		amidáz		+	-
SPBC23G7.13c		urea transzporter		+	-
SPAC212.04c		hipotetikus fehérje		+	+
SPBP4G3.03		hipotetikus fehérje		+	+
SPBC1861.01c	cnp3	centromer fehérje		+	+

13. táblázat sep10 és fhl1 által egyaránt szabályozott gének

(+) mRNS szint növekedett, (-) mRNS szint csökkent

4.2 Az rsv1 gén vizsgálata

Doktori munkám másik részében a Sep10 mediátor alegység által regulált másik transzkripciós faktort, az rsvl gént vizsgáltam. Az rsvl egy cink-ujj típusú transzkripciós faktort kódol, amely a glükóz éhezés hatására stacioner fázisba lépő sejtek túléléséhez szükséges (Hao és mtsai, 1997). Mivel a korábbi adatok alapján a glükóz éhezésre adott válaszreakcióban résztvevő gének evolúciósan konzervatívnak tűntek, ezért megpróbáltuk ezt kísérletesen is igazolni rsv1 gén esetében, interspecifikus az komplementációs analízissel.

4.2.1 Az rsv1 gén homológjainak meghatározása

A glükóz jelenlétének vagy hiányának érzékelésére bonyolult kaszkád rendszerek alakultak ki. Ilyen a glükóz hiányában aktiválódó cAMP kaszkád, mely evolúciósan konzervatív (Papp és mtsai, 2016). Az *rsv1* transzkripciós faktor illetve az általa kódolt protein, mint a cAMP útvonal effektor molekulája, valószínűleg szintén az evolúciósan konzervatív proteinek közé tartozik. Azaz feltételeztük, hogy a szekvenciahomológjai megtalálhatóak a különböző gombafajokban. Legalább is ezt sugallta Hao és munkatársainak cikke, akik az *S. pombe rsv1* génjének homológjait megtalálták *Saccharomyces cerevisiae*-ben, *Aspergillus nidulans*ban és emlősökben (Hao és mtsai, 1997).

Annak érdekében, hogy további információt nyerjünk az *rsv1* gén illetve géntermék konzervativizmusát illetően, további homológ géneket kerestünk bioinformatikai módszerekkel. Azaz, Blast analízissel megkerestük az *S. pombe rsv1* ortológ génjeit a legközelebbi rokonaiban, mint az *S. octosporus* és a dimorfizmusra is képes *S. japonicus*ban. Valamint a szintén dimorf távolabbi rokon, humán patogén *C. albicans*ban. Az utóbbi fajban három olyan gént is találtunk, amelynek a protein szekvenciája az *S. pombe* Rsv1 fehérjével homológiát mutatott. Ezek a Mig1, Try5 és Cas5 (Függelék, 1./a ábra). Mivel a homológia mértékében nem volt szignifikáns különbség, fordított Blast analízist végeztünk a Pombase adatbázisban. A fordított Blast analízis megmutatta, hogy a Cas5p lehet az *S. pombe* Rsv1 protein igazi homológia (Függelék, 1./b ábra). Míg a Mig1 és Tyr5 proteinek inkább az *S. pombe* Scr1 és Klf1 protein szekvenciájához hasonlítanak (Függelék, 1./c,d ábra). Az *S. octosporus, S. japonicus* és *C. albicans* ortológ gének fehérje szekvenciáit egyenként is összehasonlítottuk az *S.pombe* Rsv1 fehérjével és azt találtunk, hogy az *S. japonicus* Rsv1 transzkripciós faktor hasonlít leginkább az *S. pombe* Rsv1 proteinjéhez, míg a legkevésbé a *C. albicans* Cas5p (14. táblázat, 13. ábra, Függelék, 2. ábra).

14. táblázat Az *S. pombe* Rsv1 proteinjének páronkénti összehasonlítása más fajok Rsv1 homológjaival

S. pombe Rsv1- S. japonicus Rsv1	S. pombe Rsv1- S. octosporus Rsv1	S. pombe Rsv1- Candida albicans Cas5	
Expect = 3e-37	Expect = 3e-37	Expect = 3e-37	
Identities = 56/71 (79%)	Identities = 99/167 (59%)	Identities = 27/53 (51%)	
Positives = 60/71 (84%)	Positives = 120/167(71%)	Positives = 37/53 (69%)	

4.2.2 Konzervatív domének analízise

Mivel a korábban talált *S. pombe rsv1* homológ gének esetében a homológia főként a C2H2 doménre korlátozódott, mi is megvizsgáltuk az általunk talált homológ proteinek cink-ujj doménjét (Függelék, 2. ábra). Azt találtunk, hogy a C2H2 domén tekintetében a *Schizosaccharomyces* fajon belül az Rsv1 protein szekvenciája igen konzervatív, ugyanis a homológia mértéke 85% volt a páronkénti összehasonlításban (Függelék, 3/a,b ábra), míg a *C. albicans*ban az aminosav egyezés csak 51% volt (Függelék, 3/c ábra). Ezen kívül többszörös szekvenciaillesztést is végeztünk és Weblogo program segítségével meghatároztuk a konzervatív aminosavakat a négy fajban (14/b ábra).

Figyelembe véve, hogy a négy fajban talált homológ régió nem csupán a cink-ujj doménre korlátozódik, megvizsgáltuk a doménen kívül eső régiót is. Ezen protein szakasz hossza eltérést mutatott a négy fajban. 103 aminosav hosszú szakaszt azonosítottunk *S. octosporus*ban, 20 aminosavból álló régiót a *C. albicans*ban, míg 15 aminosav hosszúságú szekvenciát az *S. japonicus*ban (14/a ábra).





14. ábra Az S. pombe rsv1 gén és ortológjainak páronkénti illesztése.
a) az ábrán szürke szín jelöli a proteinek C2H2 doménjeit. Fekete színnel a konzervatív régiót jelöltük. Az ábra b) része a négy faj C2H2 doménjeinek illesztése során kapott konzervatív aminosavakat mutatja (Weblogo).

4.2.3 Az *Arsv1* mutáns fenotípusának vizsgálata

Az *rsv1* transzkripciós faktor a stacioner fázisban való túléléshez szükséges (Hao és mtsai, 1997). Stacioner fázisban a sejtek fala megvastagodott, így ellenállóbbak a környezeti stresszel szemben. Ennek következtében a $\Delta rsv1$ mutáns sejtek érzékenyek DNS károsító ágensekre, mint például hidroxiureára és thiabendazolra, illetve etanolra és nehezen tolerálják a magas hőmérsékletet is (Hao és mtsai, 1997). Annak érdekében, hogy tovább bővítsük ismereteinket az *rsv1* deléciós mutáns törzs fenotípusát illetően, megvizsgáltuk a sejteket további környezeti stressz jelenlétében. A 15. ábra mutatja, hogy az *rsv1* mutáns érzékeny a sejtfalkárosító Congo red (10 µg/ml) és Caspofungin (150 mg/ml) drogokra. Szintén érzékenyek a sejtek ecetsavra (0,3%), koffeinre (10mM), illetve 25°C-on is gyengébb volt a telepformálási képességük a vad típusú törzshöz képest. Továbbá a Hao és munkatársai (1997) által megállapított etanol (8%) és hőérzékenységet (37°C), mi is megerősítettük.



15. ábra Az *S. pombe rsv1* gén szükséges a sejtek túléléséhez stressz körülmények mellett. Kiindulási sejtszám 5×10^5 sejt/ml. Cseppek sorrendje: OD₅₉₅0,2, 10x, 100x, 1000x hígítás (balról jobbra). 10 µl lett kicsepegtetve a hígítási sor sejtszuszpenzióiból YEA-ra, (inkubálva 25°C, 30°C vagy 37°Con), YEA+8% etanol, YEA+0,3% ecetsav, YEA+10mM koffein, YEA+150 mg/ml kaszpofungin, YEA+10 µg/ml congo red táptalajokra. Ez utóbbiakat 30°C-on 4 napig inkubáltuk.

4.2.4 Fajok közötti komplementációs vizsgálat

Az adatbázisokban azonosított protein szekvenciák közötti bioinformatikai módszerekkel megállapított hasonlóság nem feltétlenül jelenti azt, hogy ezek a gének azonos funkciót látnak el. Ennek a kérdésnek a tisztázása érdekében, megvizsgáltuk a kérdéses három faj *rsv1/Cas5* génjeinek működését az *S. pombe rsv1* deléciós mutáns törzsben.

Első lépésben az S. octosporus és C. albicans vad típusú törzsekből

genomi DNS-t izoláltunk, majd PCR reakcióval felszaporítottuk az $rsv1^+/Cas5^+$ géneket. A *S. japonicus rsv1^+* génje intronokat tartalmazott, így annak érdekében, hogy csak a kódoló régióval dolgozhassunk, RNS-t izoláltunk *S. japonicus* vad típusú törzsből, majd cDNS-é írtuk át. Ezután pedig a cDNS-ről szaporítottuk fel az $rsv1^+$ gént. A PCR reakciót a 3.3. fejezetben leírt primerekkel végeztük a 3.5.2. fejezetben részletezett paraméterek mellett. A PCR termékeket először a pJET1.2 vektorba klónoztuk tompa véggel. Következő lépésben pedig a géneket pREP41 túltermelő vektorba klónoztuk, az NdeI és BamHI vágóhelyekre. A pREP41 egy közepes expressziós szintet biztosító vektor, melynek a promótere az *nmt1*⁺, tiaminnal szabályozható. A folyamat menetét a 16. ábrán foglaltuk össze. A transzformálást elektroporátorral végeztük, és a sejteket tiamin tartalmú minimál táptalajra szélesztettük. Néhány napos inkubálás után a transzformáns telepeket leizoláltuk és tovább vizsgáltuk őket.



16. ábra Az $rsv1^+/Cas5^+$ gének klónozásának menete.

Miután a plazmidvesztéses kísérlettel is meggyőződtünk arról, hogy az S. pombe Arsv1 sejtek tartalmazzák az idegen fajokból származó $rsv1^+/Cas5^+$ géneket, elindítottuk a transzformáns telepek fenotípusos vizsgálatát. Hao és munkatársai leírták, hogy a funkcióképes vad típusú $rsv1^+$ gén szükséges a sejtek életképességének fenntartásához glükóz limitált környezetben (Hao és mtsai, 1997). Ezért első lépésben megvizsgáltuk a transzformánsok telepformálási képességét. A sejteket csökkentett, 0,5% glükóz tartalmú tápfolyadékban szaporítottuk addig, amíg elérték a stacioner fázist (3-5 nap). Ezt követően minimál táptalajra szélesztettük a sejteket és megszámoltuk a kinőtt telepeket. A kísérletet háromszor ismételtük meg, majd átlagot számítottunk az értékekből (15. táblázat). A táblázat adataiból látszik, hogy mindhárom faj $rsv1^+/Cas5^+$ génje képes volt javítani az S. pombe Arsv1 törzs túlélő képességét glükóz limitált körülmények mellett, az üres vektorral transzformált sejtekhez viszonyítva. A leginkább az S. octosporus $rsv1^+$ génje, míg a legkevésbé az S. japonicus $rsv1^+$ génje növelte a túlélőképességet glükóz éhezéskor.

15. táblázat A transzformánsok telepformáló képessége glükóz megvonást követően

A transzformáns törzs száma és genotípusa	Telepformáló képesség glükóz éhezés után (%)
112: $rsv1\Delta^{S.p}$ + pREP41	25
111: $rsvI\Delta^{S.p}$ + pREP41 + $rsvI^{+S.o}$	47
214: $rsv1\Delta^{S.p}$ + pREP41 + $rsv^+I^{S.j}$	30
318: $rsv1\Delta^{S.p}$ + pREP41 + $Cas5^{+C.a}$	44

S.p: Schizosaccharomyces pombe, S.o: Schizosaccharomyces octosporus, S.j: Schizosaccharomyces japonicus, C.a:Candida albicans, rsv1⁺: vad típusú allél

Ezen kívül megvizsgáltuk a transzformánsokat különböző környezeti stressz jelenlétében is. Ahogyan a 15. ábrán is szemléltettük, az S. pombe $\Delta rsvl$ sejtek nehezen tolerálják a különböző drogok jelenlétét. Annak érdekében, hogy további információt nyerjünk a homológ gének komplementációs képességét illetően, megvizsgáltuk a transzformáns sejteket etanol, koffein, caspofungin jelenlétében, illetve magas és alacsony hőmérsékleten is (17. ábra). Ebben az esetben is működőlépes volt mindhárom gén, de láttunk különbséget a három különböző fajból származó rsv1⁺ gén komplementációs mértékét illetően. Habár az S. octosporus a legközelebbi rokona az S. pombe-nek, $rsv1^+$ génjének túltermelése nem növeli az S. pombe Arsv1 sejtek túlélését koffein tartalmú táptalajon. Míg a legalacsonyabb homológiát a C. albicans Cas5 génjével összehasonlítva találtuk, mégis a komplementáció mértéke meghaladja mind az S. japonicus, mind pedig az S. octosporus $rsv1^+$ génje esetében tapasztaltakat. Ezen kívül eltérést tapasztaltunk a három faj komplementációjában etanol és caspofungin jelenlétében is (17. ábra).
			25°C				37°C					
Vad típusú törzs	0	0	٥	*	•	۲			0	•	*	1
$rsv1\Delta^{S.p.}$ +vektor	0	0		*	1						×	
$rsv1\Delta S.p.+rsv1^{S.o.}$	0	0	۲	*	0					•	۲	197
$rsv1\Delta$ ^{S.p.} + $rsv1$ ^{S.jap.}	0	0		*		٢				0	۲	8
$rsv1\Delta^{S.p.}+Cas5^{C.a.}$	0	0	٢	*	0	0				0	*	die Geo
	Kasz	pof	ung	in		Eta	nol			Kof	fein	
Vad típusú törzs	Kasz	2pof	iung	in 🐝		Eta	nol	₩.	•	Kof	fein	-e:-
Vad típusú törzs <i>rsv1∆ ^{S.p.}</i> +vektor	Kasz	2pof • *	ung	in ×	•	Eta	inol	¥.) ()	Kof	fein	18 1 12
Vad típusú törzs <i>rsv1∆ ^{S.p.}</i> +vektor <i>rsv1∆ ^{S.p.} +rsv1^{S. o.}</i>	Kasz () () () () () () () () () ()	2pof • • •	ung () () () () () () () () () () () () ()	in ຈ		Eta	inol () () () () () () () () () ()	∛: ₩) () ()	Kof	fein	• * *
Vad típusú törzs $rsv1\Delta^{S.p.}$ +vektor $rsv1\Delta^{S.p.}$ + $rsv1^{S.o.}$ $rsv1\Delta^{S.p.}$ + $rsv1^{S.jap.}$	Kasz () () () () () () () () () ()	zpof	ung * * *	<mark>;in</mark> 嗦		Eta	inol * * *	新 兼 湯) () () () () () () () () () () () () ()	Kof	fein	· · · · ·

17. ábra Az S. octosporus, S. japonicus rsv1 és C. albicans Cas5
génje képes elnyomni az S. pombe Δrsv1 mutáns törzs érzékenységét az üres vektorral transzformált sejtekhez képest. OD 595:0.2, 10x, 100x, 1000x
higítási sorból 10 μl kicsepegtetve EMMA és EMMA+kiegészítők táptalajra (8% etanol, 10mM koffein, 200 ng/ml kaszpofungin).

5. Diszkusszió

A doktori munkám célja két olyan *Schizosaccharomyces pombe* transzkripciós faktor vizsgálata volt, melyek a Sep10 mediátor alegység által szabályozottak.

Egyik esetben az *fhl1* fork-head típusú transzkripciós faktor működését szerettük volna jobban megismerni, illetve az általa szabályozott géneket azonosítani. Ennek érdekében, első lépésben génexpressziós vizsgálatot végeztünk a Szilagyi és mtsai által létrehozott fhl1 deléciós törzsben, hogy megtudjuk, mely gének kifejeződését tartja az fhl1 gén kontroll alatt (Szilagyi és mtsai, 2005). Mivel a tápanyag az egyik legfontosabb szignál a sejtek életében, két eltérő összetételű tápközegben is megvizsgáltuk a gének expresszióját. A mikroarray adatok arra utaltak, hogy több mint 70 gén transzkripciójára van befolvással az *fhl1* transzkripciós faktor (9. ábra, Függelék, 1. és 2. táblázat). Ezen gének azonosítása révén, sikerült meghatározni azokat a géneket is, amelyek a Sep10 target gének között feltehetően indirekt módon szabályozódnak a Sep10 alegység által, s csak az *fhl1* mRNS szintjének változása következtében jelentek meg (Miklos és mtsai, 2008) (13. táblázat). Erdeményink alapján az is kiderült, hogy az *fhl1* target géneknek csak egy része szabályozódik közösen a Sep10 alegységgel (13. táblázat).

A $\Delta fhl1$ törzs mikroarray adatainak kiértékelése arra is rávilágított, hogy az Fhl1 protein által szabályzott gének különbözőek lehetnek a különböző körülmények között. Hiszen a két különböző tápközegben a target géneknek csak egy része volt azonos (7. táblázat; Függelék, 1. és 2. táblázat). Ugyanakkor a target gének funkciójának beazonosítása és a GO (Gene Ontology) kategóriák szerinti csoportosítása alapján elmondható, hogy a különbözőnek tünő gének is többnyire azonos GO kategóriákba voltak sorolhatók (Függelék, 1. és 2. táblázat), azaz a táptalajtól függetlenül az *fhl1* gén jól definiálható géncsoportok szabályzásáért felelős.

Az *fhl1* által regulált gének részletesebb vizsgálata rávilágított, hogy ezek egy nagyobb csoportja, az ún. nitrogénéhezés indukálta gének közé tartozik, azon belül is többnyire olyanok, amelyek későn indukálódnak a nitrogénforrás megvonását követően (8. táblázat)(Mata és mtsai, 2002). Közülük kiemelhetők a stell és mei2 gének, amelyek a szexuális differenciáció kulcsregulátorai (Sugimoto és mtsai, 1991; Watanabe és Yamamoto, 1994). Ezért a target gének közül kiválasztottuk a mei2 gént további vizsgálatra, s Northern blot kísérlettel igazoltuk, hogy a mei2 expressziós szintje valóban megemelkedett az Afhl1 mutánsban a vad típusú sejtekhez képest (10. ábra). Ez arra utal, hogy az *fhl1* negatív regulátora lehet a mei2-nek. Ezen túlmenően, az fhl1 sporulációban való részvételét a sporulációs teszttel is sikerült igazolni, hiszen az *fhl1* mutációja következtében magasabb volt a sejtek spóraképző képessége a mutációt nem tartalmazó sejtekhez képest (9. táblázat). Mindez pedig összhangban van a korábban Szilágyi mtsai által megállapított sejtciklusbeli és rendellenességekkel (Szilagyi és mtsai, 2005).

S. cerevisiae-ben az *Fhl1* gén a riboszómális proteineket kódoló géneket szabályozza, s amelyek expresszióját a TOR útvonal szabályozása alatt végzi (Martin és mtsai, 2004; Rudra és mtsai, 2005). Érdekes módon az *S. pombe fhl1* esetében a riboszómális gének szabályozása nem volt nagyon jellemző, hiszen csak néhány riboszómális proteint kódoló gén expressziója változott meg az *fhl1* gén deléciója következtében (Függelék, 1. és 2. táblázat). Abban azonban a két élesztőgombafaj *fhl1* génjének működése

megegyezik, hogy mindkettő kapcsolatba hozható a TOR szignalizációs útvonallal. Hiszen jelentős számban találtunk olyan géneket a *tor2-ts* és $\Delta fhl1$ mikroarray adatainak összehasonlítása után, amelyek arra utaltak, hogy mindkét gén kontrollja alatt állnak (10. táblázat) (Matsuo és mtsai, 2007).

A *tor2* és *fhl1* gének lehetséges kapcsolatát kísérletesen is igazoltuk. A *tor2-ts* (ts: temperature sensitive) mutáns sejtek "hypermater" fenotípussal rendelkeznek, vagyis nitrogénben gazdag környezetben is úgy viselkednek, mintha nitrogénre éheznének. Vagyis a sejtek szexuális ciklusba lépnek és megemelkedik a nitrogénéhezés kiváltotta gének expressziója, köztük a sporulációban fontos géneké. A *tor2-ts* sejteknek ezt a fenotípusát az *fhl1*⁺gén túltermelése képes volt csökkenteni (11. táblázat, 11. ábra). Northern blot kísérlettel sikeresen igazoltuk azt is, hogy a csökkent sporulációs képességgel összhangban, az *fhl1*⁺ gén túltermelése a meiózisban szerepet játszó gének megemelkedett szintjét csökkentette a *tor2-ts* mutánsban (12. ábra).

A túlzott sporulációs képességen kívül a *tor2-ts* mutáns sejtek hőérzékenyek is, vagyis magas hőmérsékleten nem képesek nőni, illetve a rapamycin is gátló hatással van a sejtekre. Az *fhl1*⁺ túltermelése mind a rapamycin érzékenységet, mind pedig a hőérzékenységet csökkentette a *tor2-ts* mutánsban (11. ábra), további bizonyítékot adva az *fhl1* és a TOR útvonal kapcsolatára.

Mindezek során, megfigyeltük továbbá azt is, hogy a *tor2-ts* sejtek különböző alléljai eltérően reagáltak az *fhl1*⁺ gén jelenlétére (11. ábra). Ennek a magyarázata a *tor2-ts* allélok különbözősége, a különböző pozícióban lévő mutációk lehetnek (Matsuo és mtsai, 2007).

S. pombe-ban a nitrogénéhezés szignálra mind a TORC1, mind pedig a TORC2 reszponzív. Míg TORC2 negatívan hat a nitrogén éhezéskor

indukálódó gének expressziójára, addig a TORC1 indukálja azon gének expresszióját (Weisman és mtsai, 2007). Figyelembe véve, hogy a meiózis kulcsregulátora, a stell illetve ezen gén targetjei megemelkedett szintet mutattak az fhl1 mutánsban (8. táblázat), feltételezhetően az fhl1 gén a TORC1-el áll kapcsolatban. Azonban az egyéb nitrogén éhezéskor indukálódó gének egy része csökkent az fhl1 gén hiányában, hasonlóan a Ator1 sejtekhez, ezért az fhl1 génnek a TORC2-vel való lehetséges kapcsolatát is megvizsgáltuk. Ez esetben az fhl1 túltermelése nem volt hatással a $\Delta tor 1$ sejtekre (13. ábra), legalábbis a $\Delta tor 1$ sejtek két legerősebb fenotípusát, a hőérzékenységet és a rapamycin intoleranciát illetően. Hiszen egyik mutáns fenotípusos jelleget sem volt képes az *fhl1*⁺ túltermelése elnyomni. Mindez azonban még nem jelenti feltétlenül azt, hogy az *fhl1* és a tor1 között teljesen kizárható a kapcsolat, hiszen a génexpressziós adatok összehasonlítása alapján néhány közösen regulált gén elképzelhető, hogy létezik. Így ennek a kérdésnek a további vizsgálatára még újabb kísérletek szükségesek.

Az eredményeinket összegezve az *fhl1* gént illetően tehát elmondható, hogy a nitrogén éhezéskor indukálódó és a meiózisban fontos gének negatív regulátoraként karakterizálhatjuk, mely szerepét a TORC1 komplex irányítása alatt tölti be, azaz a TOR szignalizációs útvonal része.

Az *rsv1* transzkripciós faktor szintén egy kaszkád része, mely ugyancsak tápanyag szignált közvetít. Ugyanis, a glükóz éhezéskor aktiválódó cAMP szignál kaszkád negatív szabályozása alatt tartja az *rsv1* gént (Hao és mtsai, 1997). Amikor a sejtek glükózra éheznek, megállítják a vegetatív növekedésüket és nyugalmi fázisba térnek. Ahhoz, hogy a sejtek a

stacioner fázisban hosszú távon fenn tarthassák az életképességüket szükségük van az *rsv1* gén jelenlétére.

Bioinformatikai megfigyelések alapján a S. pombe Rsv1 protein szekvenciájával homológ proteinek megtalálhatóak a S. cerevisae-ben, Aspergillus nidulansban és emlősökben is (Hao és mtsai, 1997). A szekvencia hasonlóság azonban nem minden esetben jelent funkcionális azonosságot. Célunk tehát az volt, hogy az rsvl génről, mint a glükóz hiányában aktiválódó szignálkaszkád effektor molekulájáról további információt nyerjünk, s kísérletesen is bizonyítsuk az rsv1 ortológ gének funkcionális homológiáját. Így, a szekvencia hasonlóság alapján további ortológ géneket azonosítottunk (14. táblázat, 14. ábra, Függelék, 1.ábra). Megállapítottuk, hogy a *rsv1* gén szekvenciája evolúciósan konzervatívnak tűnik, azaz nagyon hasonló a hasadó élesztőcsoporton belül. Továbbá találtunk ortológot C. albicansban is. A fehérjeszekvenciák analízise azt is megmutatta, hogy a hasonlóság főként a C2H2 (cink-ujj) domént érinti, azonban a doménen kívül is találtunk homológ régiókat (14./a ábra). Az ortológ gének klónozása (16. ábra) és túltermeltetése az S.pombe rsv1 mutáns sejtekben, egyértelműen igazolta a vizsgált gének funkcionális homológiáját (17. ábra), azaz mind az S. japonicus, és S. octosporus, mind pedig a C. albicans ortológ génjei (rsv1⁺/Cas5⁺) képesek voltak működni az S.pombe sejtekben, s helyreállítani a mutáns sejtek fenotípusát. Külön érdekes volt azonban, hogy a komplementáció mértéke különböző volt az egyes jellegeknél és törzseknél, s nem feltétlenül korrelált a szekvenciák páronkénti illesztésének adataival. Hiszen ezek alapján az S. japonicus génnek kellett volna a legerősebben komplementálnia (14. táblázat). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a különböző fajokból származó ortológok esetében a C2H2 cink-ujj doménen kivüli konzervatív régiók erősen befolyásolták az ortológ gének működését.

Az eredményeinket tekintve tehát, az *rsv1* gént a glükóz éhezés hatására aktiválódó szignál kaszkád evolúciósan konzervatív regulátoraként jellemezhetjük.

6. Összefoglalás

Jelen tanulmányban a *Schizosaccharomyces pombe* egyik forkhead és egyik cink-ujj típusú transzkripciós faktorának vizsgálatával foglalkoztunk. Mint korábban kiderült, mindkettő a Sep10 regulátor szabályzása alá tartozik, s mindkét transzkripciós faktor szerepet játszik a tápanyagérzékelésben. Az *rsv1* cink-ujj típusú transzkripciós faktor a glükózérzékelésben fontos, míg a forkhead típusú *fhl1* fork-head típusú transzkripciós faktor illetően, a következőképpen foglalhatók össze:

-Mikroarray analízissel meghatároztuk az *fhl1* transzkripciós faktor lehetséges target génjeit, s kiderült, hogy több mint 70 gén működését befolyásolja (9. ábra; Függelék, 1. és 2. táblázat).

A két különböző körülmény között tenyésztett sejtek génexpressziós vizsgálata rávilágított, hogy egy transzkripciós faktor target génjei részben változhatnak a külső körülményektől függően (Függelék, 1. és 2. táblázat).
 Bár több olyan gént is azonosítottunk, amelyek mRNS szintje a táptalajtól függetlenül módosult az *fhl1* mutáció következtében (7. táblázat).

-A target gének funkciójának meghatározása, GO kategóriákba való csoportosítása azonban felfedte, hogy az *fhl1* különböző körülmények között működő target génjei többnyire azonos géncsoportba sorolhatók (Függelék, 1. és 2. táblázat).

-Egyik jól definiálható *fhl1* által regulált gécsoport, a nitrogén éhezéskor indukálódó gének csoportja (8. táblázat). Ezek között jónéhány gént találtunk, amelyek a transzport illetve a mating és meiózis folyamatában játszanak szerepet (8, 12 táblázat). Ezek alapján feltételezhető az *fhl1* meiózisban való szerepe, amit megerősített a mutáns sejtek sporulációs képességének vizsgálata is (9. táblázat), illetve a *mei2* Northern blot analízise (10. ábra)

-A génexpressziós profilok összehasonlítása megmutatta a *tor2* és az *fhl1* gének közötti kapcsolatot (10. táblázat), melyet kísérletesen is sikerült bizonyítani az *fhl1* gén túltermeltetésével a *tor2-ts* sejtekben. Ugyanis azt találtuk, hogy az *fhl1* gén túltermelése csökkentette a rapamycin és hőmérséklet érzékenységet és a túlzott spórázóképességet a *tor2-ts* sejtekben (11, 12. ábra, 11. táblázat).

-Bemutattuk továbbá azt is, hogy az $fhl1^+$ gént tartalmazó *tor2-ts* sejtek csökkent spórázóképessége mögött a meiózisban szerepet játszó gének csökkent expressziós szintje áll (12. ábra).

Így az eredményeinkre alapozva tehát azt állíthatjuk, hogy a TORC1 komplex szabályozása alatt az *fhl1* transzkripciós faktor a meiózisban szerepet játszó gének és a nitrogén éhezés kiváltotta sejtválasz regulátora. -Az *rsv1* traszkripciós faktort illetően, ortológokat azonosítottunk bioinformatikai vizsgálatokkal a *Schizosaccharomyces* csoporton belül, valamint a *C. albicans*ban (14. táblázat).

-A páronkénti szekvenciaillesztések kimutatták, hogy az Rsv1 protein és homológjai főként a C2H2 (cink-ujj) doménjüben mutattak erős konzervativizmust, azonban mi találtunk homológ régiót e doménen kívül is (14/a. ábra).

-A többszörös szekvenciaillesztés az evolúciósan konzervatív aminosavakat is megmutatta a vizsgált fehérjékben (14/b. ábra).

-A homológ gének klónozása (16. ábra) és fajok közötti komplementációs analízis azt mutatta, hogy mindhárom általunk azonosított ortológ gén működőképes a *S. pombe rsv1* mutánsban, azaz megőrízte funkcionális konzervativizmusát (17. ábra, 15. táblázat). A komplementáció mértéke azonban eltérő volt, ami feltehetően a C2H2 doménen kivüli konzervatív régióknak köszönhető (14. ábra, 14. táblázat).

Összefoglalva, az eredményeink azt sugallják, hogy az *rsv1* gén ortológjai evolúciósan konzervatívak és azonos funkciót töltenek be a hasadó élesztőcsoporton belül, illetve *C. albicans*ban.

7.Summary

In this study, we investigated two Sep10 protein regulated transcription factors of *Schizosaccharomyces pombe*. One of them was the fork-head type Fhl1, while the other one was the zinc-finger type Rsv1. Earlier results revealed that both of them were involved in nutrient sensing (Hao és mtsai, 1997, Szilagyi és mtsai, 2005). Rsv1 zinc-finger protein is important in glucose sensing, while Fhl1 is responsive to changes of the external nitrogen concentration. Our findings concerning these transcription factors can be summarized in the following:

- Target genes of the *fhl1* transcription factor were identified by gene expression analyses. They revealed that more than 70 genes were regulated by *fhl1*.

- Microarray analyses of $\Delta fhll$ cells also shed light on the fact that different target genes were expressed depending on the growth conditions. However, the majority of the target genes belonged to the same GO (Gene Ontology) category.

- One distinct group of genes regulated by $\Delta fhll$ can be defined as the nitrogene stravation response genes. The majority of them were involved in mating and sporulation processes. Increased mating efficiency of $\Delta fhll$ cells confirmed the role of *fhll* in sporulation.

- Comparison of the microarray data of *fhl1* deleted strain to the gene expression analysis of $\Delta tor2$ revealed functional overlap between *fhl1* and *tor2* genes. This result was also confirmed by overexpression of *fhl1*⁺ in the *tor2* mutant strain. Namely, overexpression of *fhl1*⁺ from a strong promoter

could suppress rapamycin- and temperature sensitivity, and hypermater defect of the *tor2-ts* cells.

- In addition, Northern blot analysis showed that overexpression of $fhl1^+$ gene in *tor2-ts* cells could decrease increased expression level of the meiotic genes in the mutant cells. It was in a good agreement with those results that showed that hypermater phenotype of the *tor2-ts* cells was also decreased after overexpression of $fhl1^+$ gene.

Based on our findings, we assume that *fhl1* transcription factor of the fission yeast *S. pombe* regulates expression of meiotic genes and the nitrogen starvation response. Our data support a model in which *S. pombe* Fhl1 functions in the TOR signal transducing pathway, similar to the *S. cerevisiae* counterpart, and lies downstream of the TORC1.

- Regarding the *rsv1* transcription factor, we identified additional orthologous proteins in the *Schizosaccharomyces* group (Rsv1) and in *Candida albicans* (Cas5).

- Pair-wise alignments between orthologous proteins and *S. pombe* Rsv1 showed strong homology in the C2H2 domains. However, conserved regions outside of zinc-finger domain were also found.

- Multiple sequence alignment of the proteins (*S.pombe*, *S.japonicus*, *S. octosporus*, *C.albicans*) revealed evolutionarily conserved amino acids.

- Interspecific complementation analysis revealed that all of the orthologous genes were able to function in *S. pombe* $\Delta rsvl$ cells. However, complementation abilities of the orthologous genes originated from different species were different, which can be explained by the different lengths of the conserved regions outside of C2H2 domains.

In summary, our results suggest that *S. pombe rsv1* gene and its homologues preserved their functional homology and are evolutionarily conserved in the *Schizosaccharomyces* group and in *Candida albicans*.

8. Köszönetnyilvánítás

Legnagyobb köszönettel témavezetőmnek, Gálné Dr. Miklós Ida tanárnőnek tartozom. Mindenekelőtt köszönöm, hogy lehetővé tette a doktori dolgozatom elkészítését. Tanácsai, iránymutatásai mind a kutatás, mind pedig a doktori disszertáció elkészítése során nagyon hasznosnak és követendőnek bizonyultak.

Külön köszönöm Sipiczki Mátyás professzor úrnak, hogy hasznos tanácsaival segítette a munkámat.

Köszönöm Lakatos Zoltánnénak, a kísérletes munkában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Emri Tamásnak (Debreceni Egyetem, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék) a *C. albicans* gDNS-t.

Hálásan köszönöm az EMBO és a Campus Hungary Ösztöndíj bizottságnak, hogy lehetővé tették, a Tel Aviv Egyetemmel való együttműködést. Egyúttal köszönöm Prof. Ronit Weisman-nak és Prof. Martin Kupiec-nek, hogy szeretettel fogadtak és segítették az ottani munkámat.

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

Végül hálásan köszönöm a családomnak a kitartó támogatását, és hogy kiegyensúlyozott, nyugodt hátteret biztosítottak mindvégig a tanulmányaim és a doktori disszertáció elkészítése során.

9. Irodalomjegyzék

Álvarez B, Moreno S (2006) Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. J Cell Sci 119(21): 4475–4485.

Andrade MA and Bork P (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. Nat Genet 11(2): 115-116.

Angad G, Futcher B and Leatherwood J (2015) A new transcription factor for mitosis: in *Schizosaccharomyces pombe*, the RFX transcription factor Sak1 works with forkhead factors to regulate mitotic expression. Nucleic Acids Res 43 (14): 6874–6888.

Aspuria PJ, Sato T and Tamanoi F (2007) The TSC/Rheb/TOR signaling pathway in fission yeast and mammalian cells: temperature sensitive and constitutive active mutants of TOR. Cell Cycle 6 (14):1692-1695.

Astrinidis A and Henske EP (2005) Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. Oncogene 24 (50):7475-7481.

Barba G, Soto T, Madrid M, Núńez A, Vicente J, Gacto M, Cansado J and Yeast Physiology Group (2008) Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. Cell Signal 20 (4): 748–757.

Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN (1996) TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. Mol Biol Cell 7 (1): 25-42.

Bataille N, Regnacq M and Boucherie H (1991) Induction of a heatshocktype response in *Saccharomyces cerevisiae* following glucose limitation. Yeast 7 (4) : 367-378.

Batta G, Szilagyi Z, Laczik M, Sipiczki M (2009) The involvement of the *Schizosaccharomyces pombe sep9/spt8* gene in the regulation of septum cleavage. FEMS Yeast Res 9(5): 757-767.

Beijerinck MW (1894) *Schizosaccharomyces octosporus, eine achtsporige* Alkoholhefe. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde 16: 49-58.

Bjornsti MA and Houghton PJ (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. Nat Rev Cancer 4 (5): 335-348.

Blagosklonny MV (2006) Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. Cell Cycle 5 (18): 2087-102.

Boucherie H (1985) Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 61(1):385-92.

Buck V, Shien Ng S, Ruiz-Garcia A, Papadopoulou K, Bhatti S, Samuel JM, Anderson M, Millar JBA, McInerny CJ (2004) Fkh2p and Sep1p regulate mitotic gene transcription in fission yeast. J Cell Sci 117 (23): 5623–5632.

Bulmer R, Pic-Taylor A, Whitehall SK, Martin KA, Millar JBA, Quinn J, Morgan BA (2004) The forkhead transcription factor Fkh2 regulates the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. Eucaryotic Cell 3 (4): 944–954.

Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. Curr Opin Microbiol 2 (2): 202-207.

Chan S (2004) Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. Br J Cancer 91 (8):1420-1424.

Chua G (2013) Systematic genetic analysis of transcription factors to map the fission yeast transcription-regulatory network. Biochem Soc Trans 41(6): 1696-700.

Cohen A, Kupiec M and Weisman R (2014) Glucose activates TORC2-Gad8 protein via positive regulation of the cAMP/cAMP-dependent protein kinase A (PKA) pathway and negative regulation of the Pmk1 proteinmitogen-activated protein kinase pathway. J Biol Chem 289 (31):21727– 21737.

Cooper T (2002) Transmiting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to GATA factors: connecting the dots. FEMS Microbiology Reviews 26 (3): 223-238.

Dongrong C, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, and Bähler J (2003) Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. Mol Biol Cell 14 (1): 214–229.

Drebot MA, Barnes CA, Singer RA, Johnston GC (1990) Genetic assessment of stationary phase for cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 172 (7):3584-3589.

Efeyan A and Sabatini DM (2010) mTOR and cancer: many loops in one pathway. Curr Opin Cell Biol 22 (2): 169-176.

Emri T, Molnar Z, Szilagyi M, Pocsi I (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. Appl Biochem Biotechnol 151 (2-3):211-220.

Gajiwala KS, Burley SK (2000) Winged helix proteins. Curr Opin Struct Biol 10 (1): 110–116.

Grallert A, B Grallert, Zilahi E, Szilagyi Z, Sipiczki M (1999) Eleven Novel sep genes of *Schizosaccharomyces pombe* required for Efficient Cell separation and Sexual differentation. Yeast 15 (8):669-686.

Grallert A, Grallert B, Ribar B, Sipiczki M (1998) Coordination of initiation of nuclear division and initiation of cell division in *Schizosaccharomyces pombe*: genetic interactions of mutations. J Bacteriol 180 (4):892-900.

Grallert A, Miklos I, Sipiczki M (1997) Division-site selection, cell separation and formation of anucleate minicells in *Schizosaccharomyces pombe* mutants resistant to cell wall lytic enzymes. Protoplasma 198 (3-4) :218-229.

Hao Z, Furunobu A, Nagata A, Okayama H (1997) A zinc finger protein required for stationary phase viability in fission yeast. J Cell Sci 110 (20): 2557-2566.

Hay N, and Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev 18 (16): 1926-1945.

Hayashi T, Hatanaka M, Nagao K, Nakaseko Y, Kanoh J, Kokubu A, Ebe M and Yanagida M (2007) Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe tor2* mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. Genes Cells 12 (12): 1357-1370.

Heitman J, Movva NR and Hall MN (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science 253 (5022): 905-909.

Helston RM, Box JA, Tang W, Baumann P (2010) Schizosaccharomyces cryophilus sp. nov., a new species of fission yeast. FEMS Yeast Res 10 (6):779-786.

Herman PK (2002) Stationary phase in yeast. Curr Opin Microbiol 5(6):602–607.

Higuchi T, Watanabe Y and Yamamoto M (2002) Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. Mol Cell Bio. 22 (1): 1–11.

Hoffman CS (2005) Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. Biochem Soc Trans 33 (1): 257–260.

Horie S, Watanabe Y, Tanaka K, Nishiwaki S, Fuijoka H, Yamamoto M, Shimoda C (1998) The *Schizosaccharomyces pombe mei4*+ gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. Mol Cell Biol 18 (4): 2118–2129.

Huang J and BD Manning (2008) The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. Biochem J 412 (2): 179–190.

Ikai N, Nakazawa N, Hayashi T and Yanagida M (2011) The reverse, but coordinated, roles of Tor2 (TORC1) and Tor1 (TORC2) kinases for growth, cell cycle and separase-mediated mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. Open Biol 1 (3): 110007.

Ikeda K, Morigasaki S, Tatebe H, Tamanoi F and Shiozaki K (2008) Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. Cell Cycle 7 (3): 358-364.

Jacinto E and Lorberg A (2008) TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. Biochem J 410 (1): 19-37.

Kanoh J and Yanagida M (2007) Tel2: a common partner of PIK-related kinases and a link between DNA checkpoint and nutritional response? Genes Cells 12 (12): 1301-1304.

Kapahi P and Zid B (2004) TOR Pathway: Linking Nutrient Sensing to Life Span. Sci Aging Knowl Environ (36): 34.

Kaufer NF, Simanis V and Nurse P (1985) Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* correctly excises a mammalian RNA transcript intervening sequence. Nature 318 (6041): 78-80.

Kawai M, Nakashima A, Ueno M, Ushimaru T, Aiba K, Doi H and Uritani M (2001) Fission yeast *tor1* functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. Curr Genet 39 (3): 166-174.

Kojima I, Cheng YR, Mohan V, Demain AL (1995) Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. J Ind Microbiol 14 (6):436-439.

Kumar R, Reynolds DM, Shevchenko A, Shevchenko A, Goldstone SD, Dalton S (2000) Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M phase. Curr Biol 10 (15): 896–906.

Kunitomo H, Higuchi T, Iino Y and Yamamoto M (2000) A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast stel1(+) gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. Mol Biol Cell 11(9): 3205-3217.

Lamming DW, Ye L, Katajist, P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, Davis JG, Salmon AB, Richardson A, Ahima RS (2012) Rapamycininduced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. Science 335 (6076):1638-1643.

Laor D, Cohen A, Kupiec M, Weisman R (2015) TORC1 regulates developmental responses to nitrogen stress via regulation of the GATA transcription factor Gaf1. mBio7,6(4):e00959-15

Laplante M and Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. J Cell Sci 122 (20): 3589-3594.

Laplante M and Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. Cell 149 (2): 274-293.

Lillie SH and Pringle JR (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. J Bacteriol 143 (3): 1384-1394.

Lindner P (1893) *Schizosaccharomyces pombe* n.sp., ein neuer Gahrungserreger. Wochenschrift für Brauerei 10: 1298–1300.

Linder T and Gustafsson CM (2004) The Soh1/MED31 Protein Is an Ancient Component of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* Mediator. J Biol Chem 279 (47):49455-49459.

Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P and Hall MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Mol Cell 10 (3): 457-468.

Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y and Avruch J (2005) Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. J Biol Chem 280 (25): 23433-23436.

Madrid M, Fernández-Zapata J, Sánchez-Mir L, Soto T, Franco A, Vicente-Soler J, Gacto M and Cansado J (2013) Role of the fission yeast cell integrity MAPK pathway in response to glucose limitation. BMC Microbiology (13:34) 1-12.

Martin DE and Hall MN (2005) The expanding TOR signaling network. Curr Opin Cell Biol 17(2): 158-166.

Martin DE, Soulard A, Hall MN (2004) TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the forkhead transcription factor FHL1. Cell 119(7):969–979.

Martin R, Portantier M, Chica N, Andersen MN, Mata J, and Lopez-Aviles (2017) A PP2A-B55-Mediated Crosstalk between TORC1 and TORC2 Regulates the Differentiation Response in Fission Yeast. Curr Biol 27 (2):175-188.

Mata J and Bahler J (2006) Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. Proc Natl Acad Sci U S A 103 (42): 15517-15522.

Mata J, Lyne R, Burns G and Bahler J (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. Nat Genet 32(1): 143-147.

Matsuo T, Kubo Y, Watanabe Y and Yamamoto M (2003) *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. Embo J 22(12): 3073-3083.

Matsuo T, Otsubo Y, Urano J, Tamanoi F, Yamamoto M (2007) Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. Mol Cell Biol 27(8):3154–3164.

Matsuzawa T, Fujita Y, Tohda H and Takegawa K (2012) Snf1-like protein kinase Ssp2 regulates glucose derepression in *Schizosaccharomyces pombe*. Eukaryot. Cell 11(2): 159–167.

Miklos I, Szilagyi Z, Watt S, Zilahi E, Batta G, Antunovics Z, Enczi K, Bähler J, Sipiczki M (2008) Genomic expression patterns in cell separation mutants of *Schizosaccharomyces pombe* defective in the genes *sep10* (+) and *sep15* (+) coding for the Mediator subunits Med31 and Med8. Mol Genet Genomics 279 (3): 225-38.

Maundrell K (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. Gene **123**:127-130.

Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC and Thomas G (1999) Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. Science 285(5436): 2126-2129.

Nakashima S (2002) Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function. J Biochem 132(5): 669-675.

Oh WJ, Wu CC, Kim SJ, Facchinetti,V, Julien LA, Finlan M, Roux PP, Su B and Jacinto E (2010) mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. EMBO J 29(23):3939-3951.

Otsubo Y, Yamashita A, Ohno H, Yamamoto M (2014) *S. Pombe* TORC1 activates the ubiquitin-proteasomal degradation of the meiotic regulator Mei2 in cooperation with Pat1 kinase. J Cell Sci 127(12): 2639-2646.

Ozcan S, Johnston M (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiol Mol Biol Rev 63(3):554-569.

Pan X, Lei B, Zhou N, Feng B, Yao W, Zhao X, Yu Y, Lu H (2012) "Identification of novel genes involved in DNA damage response by screening a genome-wide *Schizosaccharomyces pombe* deletion library". BMC Genomics 13:662. **Papp L, Sipiczki M, Miklos I** (2016) Expression pattern and phenotypic characterization of the mutant strain reveals target genes and processes regulated by *pka1* in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. Curr Genet 63 (3):487-497.

Petersen J and Nurse P (2007) TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. Nat Cell Biol 9(11): 1263-1272.

Pletnev P, Osterman I, Sergiev P, Bogdanov A, Dontsova O (2015) Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase. Acta Naturae 7(4): 22–33.

Prentice HL (1992) High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation. Nucleic Acids Res 20(3):621.

Ribar B, Banrevi A, Sipiczki M (1997) $sep1^+$ encodes a transcription factor homologue of the HNF-3/forkhead DNA-binding-domain family in *Schizosaccharomyces pombe*. Gene 202(1-2): 1 – 5.

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquis RA, Thoreen CC, Bar-Peled L and Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. Science 320 (5882):1496-1501.

Santangelo GM (2006) Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 70 (1): 253–282

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard A and Sabatini DM (2006) Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. Mol Cell 22(2): 159-168. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM and Sabatini DM** (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science 307(5712): 1098-1101.

Schonbrun M, Kolesnikov M, Kupiec M and Weisman R (2013) TORC2 is required to maintain genome stability during S phase in fission yeast. J Biol Chem 288(27): 19649-19660.

Schonbrun M, Laor D, Lopez-Maury L, Bahler J, Kupiec M and Weisman R (2009) TOR complex 2 controls gene silencing, telomere length maintenance, and survival under DNA-damaging conditions. Mol Cell Biol 29(16): 4584-4594.

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

Sipiczki M, Grallert B, Miklos I (1993) Mycelial and syncytial growth in *Schizosaccharomyces pombe* induced by novel septation mutants. J Cell Sci 104(2): 485–493.

Sipiczki M, Takeo K, Grallert A (1998a) Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. Microbiology 144(12): 3475–3485.

Sipiczki M, Takeo K, Yamaguchi M, Yoshida S, Miklos I (1998b) Environmentally controlled dimorphic cycle in fission yeast. Microbiology 144 (5): 1319–1330. **Sonneborn A, Bockmühl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D, Ernst JF** (2000) Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. Mol Microbiol 35(2):386-396.

Soulard A, Cohen A and Hall MN (2009) TOR signaling in invertebrates. Curr Opin Cell Biol 21(6): 825-836.

Strauss J, HK Horvath, BM Abdallah, J Kindermann, RL. Mach and CP Kubicek (1999) The function of *CreA*, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. Mol Microbiol 32 (1):169-178.

Sugimoto A, Iino Y, Maeda T, Watanabe Y and Yamamoto M (1991) Schizosaccharomyces pombe $stell^+$ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. Genes Dev 5(11): 1990-1999.

Szilagyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M (2005) Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. Gene 348:101–109.

Tatebe H, Morigasaki S, Murayama S, Zeng CT and Shiozaki K (2010) Rab-family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. Curr Biol 20(22): 1975-1982.

Terada N, Franklin RA, Lucas JJ, Blenis J and Gelfand EW (1993) Failure of rapamycin to block proliferation once resting cells have entered the cell cycle despite inactivation of p70 S6 kinase. J Biol Chem 268:12062– 12068. **Urano J, Sato T, Matsuo T, Otsubo Y, Yamamoto M and Tamanoi F** (2007) Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 3514-3519.

Uritani M, Hidaka H, Hotta Y, Ueno M, Ushimaru T and Toda T (2006) Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. Genes Cells 11(12): 1367-1379.

Vachon L, Wood J, Kwo, EJ, Laderoute A, Chatfield-Reed K, Karagiannis J and Chua G (2013) Functional characterization of fission yeast transcription factors by overexpression analysis. Genetics 194(4): 873– 884.

Valbuena N and Moreno S (2012) AMPK phosphorylation by *Ssp1* is required for proper sexual differentiation in fission yeast. J Cell Sci 125 (11):2655-2664.

Valbuena N, Moreno S (2010) TOR and PKA Pathways synergize at the level of the *Ste11* transcription factor to prevent mating and meiosis in fission yeast. Plos One 5 (7): e11514.

Wang D, Guan MP, Zheng ZJ, Li WQ, Lyv FP, Pang RY, Xue YM (2015) Transcription Factor Egr1 is Involved in High Glucose-Induced Proliferation and Fibrosis in Rat Glomerular Mesangial Cells. Cell Physiol Biochem 36 (6):2093-107.

Weisman R and Choder M (2001) The fission yeast TOR homolog, $tor1^+$, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. J Biol Chem 276(10): 7027-7032.

Weisman R, Finkelstein S and Choder M (2001) Rapamycin blocks sexual development in fission yeast through inhibition of the cellular function of an FKBP12 homolog. J Biol Chem 276 (27): 24736-24742.

Weisman R, Roitburg I, Nahari T and Kupiec M (2005) Regulation of leucine uptake by $tor1^+$ in *Schizosaccharomyces pombe* is sensitive to rapamycin. Genetics 169(2): 539-550.

Weisman R, Roitburg I, Schonbrun M, Harari R and Kupie M (2007) Opposite effects of *tor1* and *tor2* on nitrogen starvation responses in fission yeast. Genetics 175(3): 1153-1162.

Welton RM and Hoffman CS (2000) Glucose Monitoring in Fission Yeast via the *gpa2* G α , the *git5* G β and the *git3* Putative Glucose Receptor. Genetics 156 (2):513-21.

Werner-Washburne, M, Braun E, Johnston GC and Singer RA (1993) Stationary phase in the *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev 57 (2): 383-401.

Wilson D, Charoensawan V, Kummerfeld SK and Teichmann SA (2008) DBD – taxonomically broad transcription factor predictions: new content and functionality. Nucleic Acids Res. 36: D88–D92 4. Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S et al. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature 415(6874): 871–880.

Wood, V, Harris, MA, McDowall, MD, Rutherford K, Vaughan BW, Staines DM, Aslett M, Lock A, Ba["]hler J, Kersey PJ and Oliver SG (2012) PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. Nucleic Acids Res 40: D695–D699.

Wullschleger S, Loewith R and Hall MN (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. Cell 124(3): 471-484.

Yanagida M, Ikai N, Shimanuki M and Sajiki K (2011) Nutrient limitations alter cell division control and chromosome segregation through growth-related kinases and phosphatases. Phil Trans R Soc B 366 (1584): 3508–3520.

Yukawa M and Maki T (1931) *Schizosaccharomyces japonicus* nov. sp. La Bul Sci Falkultato Terkultura 4: 218–226.

Zhu G, Davis TN (1998) The fork head transcription factor Hcm1p participates in the regulation of SPC110, which encodes the calmodulinbinding protein in the yeast spindle pole body. Biochim Biophys Acta 1448(2): 236–244.

Zilahi E, Miklós I Sipiczki M (2000) The *Schizosaccharomyces pombe sep15*⁺ gene encodes a protein homologous to the Med8 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional mediator complex. Curr Genet 38 (5):227-232. Zilahi E, Salimova E, Simanis V, Sipiczki M (2000a) The *S. pombe sep1* gene encodes a nuclear protein that is required for periodic expression of the *cdc15* gene. FEBS Lett 481 (2):105-108.

Zoncu R, Efeyan A and Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol 12(1): 21-35.

Könyvek:

Hall M and Tamanoi F (2010) The Enzymes. Vol. 27, Burlington: Academic Press, 251-269. ISBN: 978-0-12-381539-2.

Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2011) The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier ISBN: 9780080931272.

MacNeill SA and Nurse P (1997) Cell cycle control in fission yeast in The Molecular and Cellular biology of the fission yeast *Saccharomyces*. Cell Cycle and Cell Biology. 698-713 Cold Spring Harbor Laboratory Press DOI: 10.1101/087969364.21C.697.

Semenza GL (1999) Transcription factors and human disease. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press ISBN 0-19-511239-3.

Shambrook J and Fritsch EF MT (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor New York. 574.873224 1/1989.

10. Függelék

1. táblázat A *Afhl1* törzs mikroarray adatai és GO (Gene Ontology)

kategóriái -minimál tápközegben tenyésztve a sejteket.

				[2-998]	[L-972]		
Probe Set ID	р	FC (abs)	Regulation	(normalized)	(normalized)	Gene Symbol	Gene Title
1772704_at	7.62E-05	31.394205	down	-2.5159101	2.4565163	fhl1	fork head
GO:0009986 - cell sur	face (cellular_compo	onent)					
1778482_at	0.030567553	1.5547842	down	-0.20435588	0.4323584	adg1	sequence orphan
1774672_at	3.05E-06	132.4303	up	3.5954258	-3.4536636	SPAC2E1P3.05c	fungal cellulose
GO:0009310 - amine o	atabolic process (bi	ological_proce	ss)				
1775519_at	9.35E-06	46.711098	up	2.8370333	-2.70866	cao1	copper amine
FYPO:0000636 - incre	ased cell population	growth rate (f	ission_yeas	t_phenotype)			
1770051_s_at	0.005606045	3.826883	up	0.72977954	-1.2063904	SPCC569.02c ///	S. pombe specific
1771221_at	0.022533065	4.906963	up	0.838949	-1.4558812	SPCC569.02c	S. pombe specific
1773009_x_at	0.016732533	4.0909486	up	0.8148308	-1.2176046	SPCC569.02c	S. pombe specific
GO:0005829 - cytosol	(cellular_componen	t)					
1769678_at	0.00881931	5.20781	down	-0.96324366	1.4174331	SPAC1142.09	dubious
1769529_s_at	1.66E-04	3.544506	up	0.9331592	-0.89242554	SPCC569.03	cell surface
1769886_s_at	0.037448414	1.7619957	down	-0.56975096	0.24745941	SPAC977.05c ///	conserved fungal
1771332_at	3.71E-05	3.892421	up	0.9217434	-1.0389243	SPCC569.03	cell surface
GO:0016071 - mRNA n	netabolic process (b	iological_proc	ess)				
1774133_at	0.001722599	1.7300032	down	-0.36287975	0.42789492	cwf26	complexed with Cdc5
GO:0006629 - lipid me	tabolic process (bio	logical_proces	is)				
1770530_at	0.016983213	1.6179187	down	-0.4586177	0.23552148	oar2	3-oxoacyl-[acyl-
GO:0006520 - cellular	amino acid metabol	ic process (bio	logical_pro	cess)			
1776249_at	7.26E-04	1.7502958	down	-0.39717707	0.4104217	SPCC132.04c	NAD-dependent
1777410_at	0.001677242	2.4482834	down	-0.58089334	0.71087724	alr2	alanine racemase
GO:0055086 - nucleob	ase-containing sma	ll molecule me	tabolic proc	ess (biological	process)		
1770232_at	0.004866412	2.651926	down	-0.5816679	0.8253727	SPCC1223.09	uricase (predicted)
1777803_at	0.010271165	1.6498119	down	-0.4237407	0.29856077	SPBPB2B2.09c	2-dehydropantoate
1769995_at	2.09E-05	3.2654989	down	-0.8459222	0.86138123	ura4	orotidine 5'-
1774520_at	0.019163009	1.6181048	down	-0.42356268	0.27074242	SPCC965.14c	cytosine deaminase
1771134_at	0.01781665	1.6438864	down	-0.33642387	0.38068676	SPCC1620.06c	ribose-phosphate
GO:0005975 - carbohy	/drate metabolic pro	cess (biologic	al_process)				
1772219_at	0.04742589	3.2641833	ир	1.1927366	-0.51398534	dak2	dihydroxyacetone
GO:0051186 - cofacto	r metabolic process	(biological_pr	ocess)				
1774679_at	0.033517152	1.8496789	down	-0.55656576	0.33070913	SPCC330.03c	NADPH-hemoprotein
1772645_at	2.06E-05	1.9847025	down	-0.47389793	0.51502484	SPCC1620.08	succinate-CoA ligase
GO:0000747 - conjuga	ition with cellular fu	ion (biologica	_process)				
1776758_at	0.006818964	2.472233	down	-0.6486533	0.6571614	msa1	RNA-binding protein
1773797_s_at	2.17E-05	100.62337	down	-3.1784737	3.4743478	matmc_1 ///	mating-type m-
1771300_at	1.03E-06	59.276333	down	-2.9914284	2.8979557	mfm2	M-factor precursor
1774031_x_at	0.007038925	3.0350716	down	-0.5697214	1.0320091	mfm1	M-factor precursor
1775329_at	0.004910511	1.5045956	up	0.336414	-0.25296178	рур1	tyrosine
1776669_at	0.001478699	2.8348508	up	0.8254264	-0.67784643	map3	pheromone M-factor
GO:0007127 - meiosis	I (biological_proces	s) [
1776005_at	0.020475926	2.5556064	ир	0.62935066	-0.724315	mei2	RNA-binding protein
GO:0034599 - cellular	response to oxidati	ve stress (biol	ogical_proc	ess)			

1778631_at	0.009462166	1.679085	up	0.4493386	-0.29833665	SPAC13F5.07c,hpz2	sequence orphan
1769543_at	0.014585451	1.6028556	up	0.2718773	-0.40876707	sro1	Stress Responsive
GO:0006351 - transcri	ption, DNA-template	d (biological_	process)				
1770416_at	0.00288104	1.7951393	down	-0.40746307	0.43663278	tfg1	transcription factor
1779992_at	0.008800316	1.7052193	down	-0.290665	0.47929224	snf22	ATP-dependent DNA
1775127_at	0.024078015	1.5288472	ир	0.36525726	-0.24718697	SPBC530.11c	transcription factor
1771018_at	0.002495465	1.7060816	down	-0.44444767	0.32623896	clr2	chromatin silencing
1779822_at	0.004070111	2.3635073	ир	0.684068	-0.5568612	map1	MADS-box
1775426_at	0.04231831	2.003371	ир	0.48270574	-0.5197239	mbx2	MADS-box
1779574_at	0.049450617	1.8691474	ир	0.65255326	-0.24982707	ste11	transcription factor
GO:0016787 - hydrolas	se activity (molecula	r_function)					
1772678_at	0.006118272	1.5864171	ир	0.31548882	-0.3502833	SPAC977.15	dienelactone
GO:0016192 - vesicle-	mediated transport	(biological_pro	ocess)				
1777969_at	0.008550542	1.584046	ир	0.42142138	-0.24219291	vps32	vacuolar sorting
GO:0007005 - mitocho	ndrion organization	(biological_pr	ocess)				
1771985_at	0.02059032	1.5159671	ир	0.34360442	-0.2566341	SPAC1565.01	conserved fungal
GO:0051287 - NAD bin	ding (molecular_fund	ction)					
1769944_at	0.023754138	1.7378063	ир	0.42285076	-0.3744165	SPAC186.02c	hydroxyacid
GO:0016491 - oxidored	ductase activity (mo	lecular_functi	on)				
1773014_at	0.009519933	1.6872423	down	-0.4507152	0.3039519	SPCC663.08c	short chain
GO:0006473 - protein a	acetylation (biologic	al_process)					
1773163_at	0.004072204	1.6278619	down	-0.35055766	0.35242066	SPBC1271.07c	N-acetyltransferase
C0:0001101 - cutoplac	mic translation (bio	la stant ann an	c1				
GO.0002101 - Cytopias	smic translation (bio	iogical_proces	5)				
1777441_at	8.07E-06	20.469946	down	-2.12331	2.2321255	rpl1603	60S ribosomal
1777441_at G0:0005783 - endopla	smic translation (bio 8.07E-06 smic reticulum (cellu	20.469946 20.469946 Jlar_compone	down nt)	-2.12331	2.2321255	rpl1603	60S ribosomal
1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at	smic translation (bio 8.07E-06 smic reticulum (celli 0.001965097	20.469946 20.469946 Ilar_compone 9.023429	down nt) down	-2.12331 -1.9671506	2.2321255 1.2065252	rpi1603 SPAC186.05c	60S ribosomal human TMEM165
1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla	smic translation (old 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell	20.469946 20.469946 Ilar_compone 9.023429 Ilar_compone	down nt) down nt)	-2.12331 -1.9671506	2.2321255 1.2065252	rpl1603 SPAC186.05c	60S ribosomal human TMEM165
C0:0002181 - Cytopias 1777441_at C0:0005783 - endopia 1772987_at C0:0005783 - endopia 1772440_at	smic translation (bio 8.07E-06 smic reticulum (celly 0.001965097 smic reticulum (celly 8.89E-04	20.469946 20.469946 Jlar_compone 9.023429 Jlar_compone 1.8585185	down nt) down nt) down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653	2.2321255 1.2065252 0.42539644	rpl1603 SPAC186.05c mug150	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan
1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772940_at 1777261_s_at	smic translation (bio 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512	20.469946 Jlar_compone 9.023429 Jlar_compone 1.8585185 2.5864258	down nt) down nt) down down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c ///	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein
1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772940_at 1777261_s_at GO:0004328 - formam	smic translation (bio) 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole	20.469946 ular_compone 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function	down nt) down nt) down down)	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c ///	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein
1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772940_at 1777261_s_at GO:0004328 - formam 1772319_at	smic translation (bio) 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325	20.469946 ular_compone 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624	down nt) down nt) down down) down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like
Co.0002131 - Cycopies 1777441_at CO:0005783 - endopla 1772987_at CO:0005783 - endopla 1772440_at 1777261_s_at CO:0004328 - formam 1772319_at CO:0006913 - nucleocc	smic reticulum (cell smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor	20.469946 ular_compone 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 : (biological_p	down nt) down nt) down down) down rocess)	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like
Co.0002131 Cytopias 1777441_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:0005783 1772940_at 1777261_s_at GO:0004328 formami 1772319_at GO:0006913 GO:0006913 nucleoct 1777851_at GO:0006913	smic reticulum (cell) smic reticulum (cell) 0.001965097 smic reticulum (cell) 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole) 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04	20.469946 ular_compone 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 : (biological_p 1.9001302	down nt) down nt) down down) down rocess) down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96
CO:0002131 Cytopias 1777441_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 GO:0005783 endopla 1777261_s_at GO:00069133 1777851_at GO:0055085	8.07E-06 smic reticulum (cell) 0.001965097 smic reticulum (cell) 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole) 0.03542325 ytoplasmic transport 2.54E-04	20.469946 ular_compone 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 : (biological_p 1.9001302 piological_proc	down nt) down nt) down down occess) down ess)	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96
1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772440_at 1777261_s_at GO:0004328 - formami 1772319_at GO:0006913 - nucleoc 1777851_at GO:0055085 - transme 1778642_at	8.07E-06 smic reticulum (cell) 0.001965097 smic reticulum (cell) 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole) 0.03542325 ytoplasmic transport 2.54E-04 0.005972176	20.469946 ular_compone 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 : (biological_p 1.9001302 piological_proc 2.516254	down nt) down nt) down down) down rocess) down tess) down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane
1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772440_at 1777261_s_at GO:0004328 - formami 1772319_at GO:0006913 - nucleoc 1777851_at GO:0055085 - transme 1778642_at 17774731_at	smic reticulum (cell smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (b 0.005972176 0.00794823	20.469946 20.469946 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cutar_function 2.4571624 i (biological_p 1.9001302 piological_proc 2.516254 2.6354165	down nt) down nt) down down down rocess) down ess) down down down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c isp4	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide
1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772440_at 1777261_s_at GO:0004328 - formami 1772319_at GO:0006913 - nucleoc 1777851_at GO:0055085 - transme 1778642_at 1774731_at 1778234_at	smic reticulum (cell smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (l 0.005972176 0.00794823 8.70E-04	20.469946 20.469946 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 i (biological_proc 2.516254 2.6354165 3.1673565	s) down nt) down down down) down rocess) down ess) down down down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053 -0.72782135	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565 0.9354579	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c isp4 SPCC285.05	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide purine nucleoside
CO:0002131 Cytopias 1777441_at GO:00057833 endopla 1772987_at GO:00057833 endopla 1772987_at GO:00057833 endopla 1772967_at GO:00057833 endopla 177291_s_at GO:0006913 nucleoc 1777851_at GO:0055085 transme 1778642_at 1774731_at 1778234_at 1771089_at GO:005085 GO:0055085	smic reticulum (cell smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (1 0.005972176 0.00794823 8.70E-04 0.008982225	20.469946 20.469946 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 i (biological_proc 2.516254 2.6354165 3.1673565 3.7571867	(down nt) down nt) down down occess) down cocess) down cocess) down down down down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053 -0.72782135 -0.8478837	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565 0.9354579 1.0617691	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c isp4 SPCC285.05 SPBPB2B2.01	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide purine nucleoside amino acid
Co.0002131 Cytopias 1777441_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1777261_s_at GO:0006913 1777851_at GO:00055085 1777851_at 1777851_at 1777831_at 1777834_at 17778629_at GO:0005788_dat	smic reticulum (cell smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (1 0.005972176 0.00794823 8.70E-04 0.008982225 0.047013465	20.469946 20.469946 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cutar_function 2.4571624 i (biological_proc 2.516254 2.6354165 3.1673565 3.7571867 1.5164138	(down nt) down nt) down down) down rocess) down cess) down down down down down	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053 -0.72782135 -0.8478837 -0.8478837	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565 0.9354579 1.0617691 0.16050084	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c isp4 SPCC285.05 SPBPB2B2.01 SPBC359.03c, aat1	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide purine nucleoside amino acid
CO:0002131 Cytopias 1777441_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1772987_at GO:00057833 1777261_s_at GO:0006913 1777291_at GO:00055085 1777851_at GO:00550855 1777831_at 1777834_at 1777899_at GO:0015089_at 1777829_at GO:0025085_	smic reticulum (cell 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (1 0.005972176 0.00794823 8.70E-04 0.008982225 0.047013465 0.022861682	20.469946 20.469946 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 i (biological_proc 2.516254 2.6354165 3.1673565 3.7571867 1.5164138 2.1749911	s) down nt) down down down) down rocess) down cess) down down down down up	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053 -0.72782135 -0.8478837 -0.44016266 0.39588198	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565 0.9354579 1.0617691 0.16050084 -0.7251275	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c isp4 SPCC285.05 SPBPB2B2.01 SPBC359.03c, aat1 oca2	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide purine nucleoside amino acid serine/threonine
CO:0002131 Cytopias 1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 177291_s_at GO:0006913 - nucleoc 1777851_at GO:0055085 - transme 1778642_at 1777834_at 1778629_at 1778629_at 1777804_at 177804_at	smic reticulum (cell 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (1 0.005972176 0.00794823 8.70E-04 0.008982225 0.047013465 0.022861682 0.016386414	20.469946 20.469946 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 i (biological_proc 2.516254 2.6354165 3.1673565 3.7571867 1.5164138 2.1749911 2.3133886	s) down nt) down down down) down rocess) down cess) down down down down up up	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053 -0.72782135 -0.8478837 -0.44016266 0.39588198 0.36978468	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565 0.9354579 1.0617691 0.16050084 -0.7251275 -0.84022284	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c isp4 SPCC285.05 SPBPB2B2.01 SPBC359.03c, aat1 oca2 SPAPB1A11.01,mfc1	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide purine nucleoside amino acid serine/threonine membrane
CO:0002131 Cytopias 1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 177291_s_at GO:0006913 - nucleoc 1777851_at GO:0055085 - transme 177854_at 1777834_at 1778642_at 177869_at 1778642_at 1778642_at	smic reticulum (cell 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (1 0.005972176 0.00794823 8.70E-04 0.008982225 0.047013465 0.022861682 0.016386414 0.006671574	20.469946 20.469946 9.023429 ular_compone 1.8585185 2.5864258 cular_function 2.4571624 i (biological_proc 2.516254 2.6354165 3.1673565 3.7571867 1.5164138 2.1749911 2.3133886 2.4458237	s) down nt) down down down) down rocess) down cess) down cess) down down down down up up	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053 -0.72782135 -0.8478837 -0.44016266 0.39588198 0.36978468 0.71507424	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565 0.9354579 1.0617691 0.16050084 -0.7251275 -0.84022284 -0.57524616	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c isp4 SPCC285.05 SPBPB2B2.01 SPBC359.03c, aat1 oca2 SPAPB1A11.01,mfc1 SPCC576.17c	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide purine nucleoside amino acid serine/threonine membrane membrane
Co.0002131 Cytopias 1777441_at GO.0005783 - endopla 1772987_at GO.0005783 - endopla 1772987_at GO.0005783 - endopla 1772987_at GO.0005783 - endopla 177291_s_at GO.0006913 - nucleoc 1777851_at GO.00055085 - transme 177851_at 1774731_at 1777864_at 1777864_at 1777864_at 177784_at 1772453_at 1772453_at	smic reticulum (cell 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (1 0.005972176 0.00794823 8.70E-04 0.008982225 0.047013465 0.022861682 0.016386414 0.006671574 0.025308918	20.469946 20.469946 20.469946 9.023429 1.8585185 2.5864258 2.4571624 2.4571624 2.603612 1.9001302 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.900100 1.9001000 1.9001000 1.9001000 1.9001000 1.9001000000 1.9000000000000000000000000000000000000	s) down nt) down down down) down rocess) down cess) down cess) down down down down up up up	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053 -0.72782135 -0.8478837 -0.44016266 0.39588198 0.36978468 0.36978468 0.71507424 -0.26665497	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565 0.9354579 1.0617691 0.16050084 -0.7251275 -0.84022284 -0.57524616 0.44357967	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 nup97 SPAC3H1.06c isp4 SPCC285.05 SPBPB2B2.01 SPBC359.03c, aat1 oca2 SPAPB1A11.01,mfc1 SPCC576.17c SPCPB1C11.03	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide purine nucleoside amino acid aemino acid serine/threonine membrane cysteine transporter
co.ou02131 cytopias 1777441_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1772987_at GO:0005783 - endopla 1777261_s_at GO:0006913 - nucleoc 1777851_at GO:0055085 - transme 177854_at 1774731_at 1778642_at 17778642_at 1777853_at 1772913_at 1772913_at 1772913_at 1775850_at South and	smic translation (bio) 8.07E-06 smic reticulum (cell 0.001965097 smic reticulum (cell 8.89E-04 0.00573512 idase activity (mole 0.03542325 ytoplasmic transpor 2.54E-04 embrane transport (1 0.005972176 0.00794823 8.70E-04 0.008982225 0.047013465 0.02861682 0.016386414 0.006671574 0.025308918 5.15E-04	20.469946 20.469946 20.469946 9.023429 1.8585185 2.5864258 2.4571624 2.4571624 2.603612 2.6354165 3.1673565 3.7571867 1.5164138 2.1749911 2.3133886 2.4458237 1.6360701 2.2470222	s) down nt) down down down) down rocess) down cess) down cess) down down down up up up up down up	-2.12331 -1.9671506 -0.46875653 -0.698544 -0.3796749 -0.4785827 -0.54207355 -0.8138053 -0.72782135 -0.8478837 -0.44016266 0.39588198 0.36978468 0.71507424 -0.26665497 -0.5360966	2.2321255 1.2065252 0.42539644 0.67241573 0.91731834 0.4475155 0.78920394 0.58422565 0.9354579 1.0617691 0.16050084 -0.7251275 -0.84022284 -0.57524616 0.44357967 0.63191766	rpl1603 SPAC186.05c mug150 SPAC212.08c /// SPAC869.04 sPAC869.04 sPAC364 sPAC364 SPAC364 SPAC364 SPAC364 SPBC355 SPBPB282.01 SPBC359.03c, aat1 oca2 SPAPB1A11.01,mfc1 SPCC576.17c SPCPB1C11.03 SPAC1039.01	60S ribosomal human TMEM165 sequence orphan GPI anchored protein formamidase-like nucleoporin Nic96 membrane OPT oligopeptide purine nucleoside amino acid serine/threonine membrane membrane cysteine transporter amino acid

GO:0061024 - membra	ane organization (bio	ological_proce	ss)				
1776572_at	0.040862236	1.7807255	down	-0.30531788	0.5271473	SPCC1620.07c	lunapark homolog
GO:0016021 - integral	component of mem	brane (cellulai	_componen	t)			
1779588_at	4.69E-04	3.140922	down	-0.81804305	0.83314514	SPAC513.04	sequence orphan
1777820_at	0.010533229	2.0027714	up	0.46921062	-0.532787	mug124	sequence orphan
1776189_at	0.003105524	1.9197735	ир	0.49697685	-0.44395924	ste4	adaptor protein Ste4
GO:0031362 - anchore	d component of exte	ernal side of pl	asma mem	brane (cellular_	component)		
1773532_at	0.008137079	1.9547527	down	-0.52547455	0.44151148	SPBPB7E8.01	sequence orphan
GO:0016192 - vesicle-	mediated transport	(biological_pr	ocess)				
1775827_at	0.001853504	1.8637831	down	-0.36708388	0.53115016	SPCC1620.12c	GTPase activating
1770505_at	0.001442815	1.8292046	down	-0.39693418	0.47428226	SPCC1620.05	Rab
GO:0006790 - sulfur co	ompound metabolic	process (biolo	gical_proce	ss)			
1778239_at	0.005158507	2.20189	down	-0.64480764	0.49393478	SPBPB10D8.02c	arylsulfatase
GO:0016787 - hydrola	se activity (molecula	ar_function)					
1770810_at	0.002443479	2.2553446	down	-0.61612016	0.5572278	SPCC1620.13	phosphoglycerate
1777339_at	1.26E-04	2.029199	down	-0.5013736	0.5195367	SPAC1039.02	phosphoprotein
GO:0006310 - DNA rec	ombination (biologic	al_process)					
1770906_at	3.63E-04	1.9713594	down	-0.4664847	0.5127061	swi2	Swi5 complex
1775967_at	0.009619867	1.9369661	down	-0.6446862	0.3091124	tlh2	RecQ type DNA
GO:0002181 - cytopla	smic translation (bio	logical_proces	55)				
1773753_at	0.04806611	1.7563149	down	-0.42753443	0.38501707	rps2202	40S ribosomal
AFFX-r2-Sp-GPD3-5_at	0.022397574	1.7858281	up	0.6017116	-0.23488171		
AFFX-Scv2-r2-Bs-dap-	0.04203872	1.565135	down	-0.20624352	0.4400436		
AFFX-DapX-3_at	0.044237364	1.5268177	down	-0.23347013	0.3770577		
AFFX-Scv2-r2-Bs-dap-	0.04822353	1.5251014	down	-0.21213436	0.3967708		
AFFX-r2-Sp-URA4-5_at	4.02E-06	3.7188013	down	-0.9431753	0.95166236		
AFFX-r2-Sp-URA4-3_at	9.03E-06	3.636873	down	-0.8960886	0.96660995		
AFFX-r2-Sp-URA4-M_at	3.35E-05	3.6053236	down	-0.88310176	0.967027		
1769794_at	0.04218117	2.2277167	down	-0.3465333	0.80903244		
1778150_at	0.041076187	1.8467051	down	-0.6011178	0.28383574		

A sárga kiemelés azt jelzi, hogy az adott gén mRNS szintje változást mutatott komplett táptalajban való tenyésztésnél is.

2. táblázat A *Afhl1* törzs mikroarray adatai és GO (Gene Ontology)

kategóriái- komplett tápközegben tenyésztve a sejteket.

Probe Set ID	р	FC (abs)	Regulation	[FHL](raw)	[TA1](raw)	Gene Symbol	Gene Title
1772704_at	1.99E-07	22.90976	down	15.086703	345.63293	fhl1	fork head transcription factor Fhl1
GO:0007127	- meiosis I (biolo	gical_process)	[
1776005_at	0.01559081	2.8895566	ир	322.2844	111.53421	mei2	RNA-binding protein involved in
GO:0007126	- meiotic nuclea	division (biolo	gical_process)			
1772026_at	0.003519763	1.6240318	ир	177.23575	109.133156	cnp3	centromere protein
1777615_at	4.47E-05	2.1069257	ир	208.55887	98.98729	mcp7	meiosis specific coiled-coil protein
GO:0000747	 conjugation wit 	th cellular fusion	n (biological_	process)			
1776189_at	0.005873388	1.4641762	ир	294.90576	201.4141	ste4	adaptor protein Ste4
GO:0016192	- vesicle-mediat	ed transport (b	ological_pro	ess)			
1777969_at	0.002734265	1.6490551	ир	1709.3805	1036.5824	vps32	ESCRT III complex subunit Vps32
GO:0015171	- amino acid trar	ismembrane tra	insporter act	vity (molecular	_function		
1771089_at	0.001509237	4.614551	ир	1383.5328	299.81943	SPBPB2B2.01	amino-acid permease
GO:0055085	- transmembran	e transport (bio	logical_proce	55)			
1772913_at	0.016539745	1.5786358	down	1782.7582	2814.3252	SPCPB1C11.03	cysteine transporter (predicted)
1770526_at	0.02228707	1.6574932	down	410.42477	680.27673	SPBC530.02	membrane transporter (predicted)
1771621_at	0.002136217	1.7938974	down	3810.454	6835.556	vht1	vitamin H transporter Vth1
1777436_at	0.002477608	1.8405973	down	1698.2561	3125.8071	SPAC869.05c	sulfate transporter (predicted)
1771947_at	0.010872522	1.9589587	down	530.92535	1040.0616	abc3	multi drug resistance-associated
1772905_at	0.016438136	3.0692341	down	104.50029	320.7357	str3	siderophore-iron transporter Str3
1778607_at	0.002266115	1.5244409	ир	6828.041	4479.0435	per1	amino acid permease
1774586_s_	0.010855495	1.5701917	ир	64.147415	40.85325	SPAC750.02c///SPAC977.04///SPBC	membrane transporter
1773768_at	1.83E-04	1.760705	ир	508.53488	288.82452	SPBC23G7.13c	urea transporter (predicted)
1777804_at	9.20E-06	1.9619615	ир	214.28056	109.21755	mfc1	membrane transporter (predicted)
1776821_at	0.011517507	1.9887395	ир	1535.37	772.03204	SPBC13A2.04c	PTR family peptide transporter
1775850_at	0.015388772	2.234907	ир	850.07495	380.36267	SPAC1039.01	gamma-aminobutyric acid/polyamine
1777373_at	1.10E-05	2.5935614	up	30.436249	11.7353115	SPAC869.03c	urea transporter (predicted)
GO:0005783	- endoplasmic re	ticulum (cellula	r_componen	t)			
1776755_at	0.02244919	1.527947	down	869.8568	1329.0957	SPBP19A11.02c	sequence orphan
1769316_s_	0.011137011	1.8172725	down	925.6111	1682.0884	SPAC750.05c///SPAC977.01///SPBC	hypothetical protein///hypothetical
<mark>1772440_</mark> at	0.010578348	1.6744963	down	133.39046	223.36191	mug150	sequence orphan
1772987_at	5.08E-09	31.415712	down	25.45626	799.72656	SPAC186.05c	GDT1-like protein
1774293_at	0.011170314	1.7719207	ир	395.55597	223.2357	SPAC212.04c	hypothetical protein
1777261_s_	3.00E-04	1.6217675	ир	1149.2198	708.6218	SPAC212.08c///SPAC212.12///SPAC	GPI anchored protein
1772389_at	0.012365799	2.247316	ир	5689.4985	2531.6855	SPAPB24D3.07c	sequence orphan
GO:0030968	 endoplasmic re 	ticulum unfolde	d protein res	ponse (biologic	al_process)		
1769825_at	5.35E-09	13.129094	down	30.866856	405.25397	SPAC186.06	isomerase
GO:0005975	- carbohydrate n	netabolic proce	ss (biological	_process)			
1772191_at	0.014399124	1.6546495	down	2523.395	4175.3306	SPAC8E11.10	sorbose reductase (predicted)
1778377_at	7.53E-05	2.0536487	down	78.075424	160.3395	SPBC2G2.17c	beta-glucosidase Psu2 (predicted)
1772219_at	0.020889763	1.4343523	ир	76.02933	53.006046	dak2	dihydroxyacetone kinase Dak2
1770831_at	0.001214995	2.114255	ир	98.21768	46.454975	mel1	alpha-galactosidase, melibiase
GO:0008483	- transaminase a	activity (molecu	lar_function)				
1778484_at	0.005145166	2.0480998	ир	712.8309	348.0451	SPAC27F1.05c	aminotransferase
GO:0004040	- amidase activit	ty (molecular_f	unction)				

1769975_at	5.62E-07	9.542298	ир	192.82838	20.20775	SPAC869.01	amidase (predicted)
GO:0006281	- DNA repair (bio	logical_process)				
1772040_at	0.009305367	1.9479964	ир	34.063576	17.48647	mag2	DNA-3-methyladenine glycosidase
GO:0061024	- membrane org	anization (biolo	gical_process)			
1777082_at	0.033879824	1.8125895	ир	416.60617	229.84026	fhn1	Fhn1 plasma membrane organization
GO:0098754	- detoxification (biological_proc	ess)				
1776535_at	0.020512657	1.7574793	ир	3000.4465	1707.2439	SPAC869.02c	nitric oxide dioxygenase (predicted)
GO:0006351	- transcription, E	NA-templated ([biological_pr	ocess)			
<mark>1771018_</mark> at	0.016798453	1.3288863	down	271.3735	360.62466	clr2	chromatin silencing protein Clr2
1769658_at	0.001823204	1.5150415	down	2150.7703	3258.5068	aes1	RNA-mediated gene silencing
1780110_at	0.005345376	1.5287539	down	700.5193	1070.9216	laf2	Clr6 associated factor 2, Laf2
1779585_at	0.008749299	1.6546513	down	31.806055	52.62793	SPBC1348.12	zinc finger protein
1774781_at	0.037830144	1.6174762	ир	248.04602	153.35376	SPAC11D3.07c	transcription factor (predicted)
1779574_at	0.006054789	1.739571	ир	2404.7756	1382.3947	ste11	transcription factor Ste11
GO:0004328	- formamidase a	ctivity (molecul	ar_function)				
1772319_at	0.01364711	1.735953	ир	43.092793	24.82372	SPAC869.04	formamidase-like protein (predicted)
GO:0007010	- cytoskeleton o	rganization (bio	logical_proce	ess)			
1773549_at	0.003603578	1.6764022	up	107.78266	64.29403	SPBC1289.14	adducin (predicted)
GO:0006520	- cellular amino	acid metabolic p	rocess (biolo	gical_process)			
1772117_at	0.002202477	1.51116	down	5673.4097	8573.424	SPBC428.11	homocysteine synthase Met17
1778039_s_	6.85E-05	1.7953395	down	1339.5212	2404.8948	SPAC977.12///SPBPB8B6.05c	L-asparaginase (predicted)///L-
1778321_at	4.20E-04	1.8392286	down	374.3984	688.60376	SPBPB8B6.05c	L-asparaginase (predicted)
1771307_at	5.73E-05	1.8847345	down	902.24426	1700.4905	SPAC977.12	L-asparaginase (predicted)
1776249 at	0.003996085	2.102029	down	553.26355	1162.9757	qdh2	NAD-dependent glutamate
1769734 5	0.006524744	1.6479791	up	2996.6685	1818.3894	SPAC186.03///SPBPB21E7.09	L-asparaginase (predicted)///L-
GO:0000079	- regulation of cy	clin-dependent/	protein serin	e/threonine kin	ase activity ((biological process)	1 2 4 200
1778543 at	0.007360289	1.6298088	up	450.95276	276.6905	psl1	cyclin pho85 family (predicted)
GO:0003688	- DNA replication	origin binding (molecular fu	inction			, , , , , ,
1771604 at	0.014156144	1.6177967	up _	386.6647	239.00706	abp2	ARS binding protein Abp2
GO:0006508	proteolysis (bio	ological proces	5)				31 1
1778370 at	0.016581852	1.5450901	up	52.01118	33.662235	SPCC1919.12c	aminopeptidase (predicted)
GO:0044732	- mitotic spindle	pole body (cell	ular compone	ent)			
1769714 at	0.034367833	1.5284898	up	673.92505	440.90897	SPAC1687.14c	calcium-binding protein
GO:0055086	- nucleobase-co	ntaining small n	nolecule meta	abolic process (l	biological pro	ocess)	51
1777803_at	1.14E-04	1.773486	down	384.38257	681.69696	SPBPB2B2.09c	2-dehydropantoate 2-reductase
1769995 at	6.03E-06	2.523756	down	1917.1125	4838.3237	ura4	orotidine 5'-phosphate decarboxylase
GO:0007005	- mitochondrion	organization (b	ological_proc	cess)			
1778661_at	0.023456208	1.5107958	down	163.46355	246.96007	trz2	mitochondrial 3'-tRNA processing
GO:0002181	- cytoplasmic tra	anslation (biolog	ical_process)			
1777441_at	6.99E-09	11.366095	down	230.03238	2614.5715	rpl1603	60S ribosomal protein L16
GO:0006790	- sulfur compour	d metabolic pro	cess (biologi	cal_process)			
1778239 at	8.03E-08	7.4519024	down	86.18243	642.2228	SPBPB10D8.02c	arylsulfatase (predicted)
FYPO:000170	1 - sensitive to	bortezomib (fis	sion_yeast p	henotype)			
1775955 at	7.81E-05	3.3074415	down	8.374027	27.6966	SPAC750.01	aldo/keto reductase family protein
0.0007155	coll adhocion (hiological proce	cc)				,

1778738_at	2.17E-05	2.8493466	down	43.142345	122.92749	SPBC359.04c	cell-type specific agglutination
GO:0006473 -	protein acetyla	tion (biological_	process)				
1773163_at	2.05E-05	1.7388079	down	745.81604	1296.8317	SPBC1271.07c	N-acetyltransferase (predicted)
GO:0009897 -	external side o	f plasma memb	rane (cellular	_component)			
1769552_s_	0.001013708	1.6416968	down	257.2283	422.29068	SPAC212.01c///SPAC750.06c///SPBC	hypothetical protein///hypothetical
GO:0051186 -	cofactor metab	olic process (bi	ological_proc	ess)			
1770272_at	2.05E-04	1.5942568	down	365.07468	582.0224	SPBC1347.09	hexaprenyldihydroxybenzoate
1779444_at	0.016373668	1.5678524	down	1494.0023	2342.3745	SPCC1739.06c	uroporphyrin methyltransferase
GO:0005829 -	cytosol (cellula	r_component)					
<mark>1769678_</mark> at	0.00224826	5.1354003	down	35.282085	181.18765	SPAC1142.09	hypothetical protein
1779731_at	0.024006007	2.4656787	down	335.4455	827.1002	SPBPB2B2.08	conserved fungal protein
1777433_at	4.14E-06	2.0546498	down	150.5293	309.28516	mug15	sequence orphan
1778047_at	0.003228826	1.8794171	down	56.63866	106.44768	mug14	adducin
GO:0003959 -	NADPH dehydro	genase activity	(molecular_	function)			
1776548_at	2.03E-06	8.150437	ир	215.45691	26.435013	SPBC23G7.10c	NADH-dependent flavin
GO:0051287 -	NAD binding (m	olecular_functi	on)				
1769944_at	1.65E-05	4.7211976	ир	57.651913	12.2112875	SPAC186.02c	hydroxyacid dehydrogenase
GO:0030163 -	protein catabol	ic process (biol	ogical_proces	55)			
1774284_at	0.007465792	2.8534813	ир	205.84319	72.13755	SPBP4G3.03	hypothetical protein
GO:0007155 -	cell adhesion (I	biological_proce	ss)				
1779048_at	1.94E-05	2.7286391	ир	273.00507	100.05173	SPAC186.01	cell surface glycoprotein (predicted),

A sárga kiemelés azt jelzi, hogy az adott gén mRNS szintje változást mutatott minimál táptalajban való tenyésztésnél is.
1. ábra/a *S.pombe* Rsv1 protein BLASTp analízise a *C. albicans* adatbázisban (Query: *S.pombe* Rsv1 protein).

orf19.4318 Candida albicans SC5314 Assembly 19 (11G1 2H2 transcription factor; repressor; regulates genes for carbon source utilization: Tup1-dependent and independent functions/ hyphal, Hap43 and caspofungin repressed; Spider and flow model biofilm induced Length = 571 CGD Locus Page | CGD Genome Browser | CGD Conserved Domains | CGD Literature Guide

<u>Score</u> = 232 (94.0 <u>bits</u>), <u>Expect</u> = 9e-20 <u>Identities</u> = 34/53 (64.2%), <u>Positives</u> = 41/53 (77.4%)

Query: 4. YEOPPOKRYTHRQEHOVRHIRSHTGERPFECSYPSCKRETTRDELIRMVATH 56 Y+O FC + FHR EHO HHIR<u>HTGERP</u>_C++P C KRF+R DEL RH+R H Sbict: 31 YKOTFDRAFHRLEHOTRHIRTHTGERPRACFFPGCTRFSGREITHRIB

or19.12140 Candido albicans SC3314 Assembly 1 CASS pranscription factor; cell wall damage response; required for adherence, responses resistance to caspofungin: repressed in corestress response; mutants have reduced CFU in mice, hyphal defect in C. clegans infections. Spide tofolim induced Length = 822

CGD Locus Page | CGD Genome Browser | CGD Conserved Domains | CGD Literature Guide

Score = 181 (74.3 bits), Expect = 7e-14 Identities = 27/53 (50.9%), Positives = 37/53 (69.8%)

Query: 2 Kaye-pp-krvphaceovaniashtoka-pp-syps-kraptardelianva 54 K ++CP C+ P & EM RH+SS+ EXPEC P+C KAP R+D L H++ Sbig1: 746 KRHKCPICESRFQRPEHVKRHLKSHSSEXPFECOMENCSKRFNRKDALKAHLK 798

orf19.3434 Candida albicans SC5314 Assembly 19 RY5 Zn(II)2Cys6 transcription factor; regulator of yeast form adherence; required for yeast cell adherence to silicone substrate Length = 990

Score = 171 (70.5 bits), Expect = 1e-12 Identities = 31/54 (57.4%), Positives = 33/54 (61.1%), Gaps = 2/54 (3%)

CGD Locus Page | CGD Genome Browser | CGD Conserved Domains | CGD Literature Guide

Query: 2 KSYECFFCKRVFHRQEHQVFHIRSHIGEKPFECSYPSCKKRFTRRDELIRHVAT 55 K Y C FC R F R EH+ RH R8HT ERFF C + C F RAD L RH RT Sbict: 5 KKYICAFCARAFTRSHKROHNERFATCH-CTSSYVRBDLIGHERT 56

1.ábra/b Reciprok BLASTp analízis az *S.pombe* adatbázisban (Query: *C.albicans* Cas5p)

Show All 💌 entries	Show/hide	columns (7	/ hidden)		8	liter		
Subject name	Subject description	Gene hit	Genomic Location	Orientation	Length	Score v	E-val	<u>%ID</u> 0
SPBP4H10.09.1 pep	pep:known chromosome:ASM294v2:II:2888450:2889979: gene:SPBP4H10.09 transcript:SPBP4H10.09.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol:rsv1 description:transcription factor Rsv1 [Source:PomBase;Acc:SPBP4H10.09]	rsv1	:2883465-2888611 [Bequence]	Forward	49 <u>(Sequence</u>)	162	3.4E-14	53.1 <u>(Alignment)</u>
SPBC107.02c.1:pep	pep:known chromosome:ASM294v2:II:1752100:1755619:1 gene:SPBC1D7.02c transcript.SPBC1D7.02c.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol:scr1 description:transcription factor Scr1 [Source:PomBase;Acc:SPBC1D7.02c]	<u>scr1</u>	<u> :1753670-1753816 [Sequence]</u>	Forward	49 <u>[Sequence]</u>	146	4.9E-12	46.9 <u>(Alianment</u>)
SPAC144.09c.1:pep	pep:known chromosome:ASM294v2:I:4669627:46714541 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol:sfc2 description:RNA polymerase III transcription factor TFIIIA [Source:PomBase;Acc:SPAC144.09c]	<u>sfc2</u>	1.4670794-4670968 [Sequence]	Reverse	44 [Sequence]	121	1.1E-8	43.2 [Alignment]
SPAC2588.19c.1:pep	pep:known chromosome:ASM294v2:I:4192070:4195228:-1 gene:SPAC25B8.19c transcript:SPAC25B8.19c.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol:loz1 description.transcription factor zFc2H2 type [Source:PomBase;Acc:SPAC25B8.19c]	loz1	1.4192663-4192803 [Sequence]	Reverse	47 [Sequence]	119	2.1E-8	42.6 <u>(Alignmenti</u>

1. ábra/c Reciprok BLASTp analízis az *S.pombe* adatbázisban (Query: *C.albicans* Mig1p)

Results table 🗉

Show All 💌 entries	Show/hide colu	mns (7 hid	lden)			Filter		X
Subject name	Subject description	Gene hit	Genomic Location	Orientation	Length	Score v	E-val	<u>%ID</u> ♦
<u>SPBC1D7.02c.1:pep</u>	pep:known chromosome:ASM294v2:II:1752100:1755619:1 gene:SPBC1D7.02c transcript:SPBC1D7.02c.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol:scr1 description:transcription factor Scr1 [Source:PomBase;Acc:SPBC1D7.02c]	<u>scr1</u>	II:1753658-1753843 [Sequence]	Forward	62 [Sequence]	302	1.4E-33	83.9 (Alignment)
<u>SP8P4H10.09.1:pep</u>	pep:known chromosome:ASM294v2:II:2888450:2889979:1 gene:SPBP4H10.09 transcript:SPBP4H10.09.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol:rsv1 description:transcription factor Rsv1 [Source:PomBase:Acc:SPBP4H10.09]	<u>[va]</u>	II:2888453-2888617 [Sequence]	Forward	55 [Sequence]	213	1.7E-21	61.8 (Alignment)
SPAC144.09c.1:pep	pep:known chromosome:ASM294v2:1:4669627:4671454:-1 gene:SPAC144.09c transcript:SPAC144.09c.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol:sfc2 description:RNA polymerase III transcription factor TFIIIA [Source:PomBase;Acc:SPAC144.09c]	<u>sfc2</u>	14670683-4670841 [Sequence]	Reverse	53 [Sequence]	124	2.1E-9	41.5 [Alignment]
SPAC2588.19c.1:pep	pep:known chromosome:ASM294/2:1:4192070:4195228:-1 gene:SPAC25B8.19c.transcript:SPAC25B8.19c.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol·loz1 description:transcription factor zF-C2H2 type [Source:PomBase:Acc:SPAC25B8.19c]	loz1	141926514192809 (Sequence)	Reverse	53 <u>[Sequence]</u>	122	4.0E-9	41.5 [Alignment]

1. ábra/d Reciprok BLASTp analízis az *S.pombe* adatbázisban (Query: *C.albicans* Try5p)

Results table 😑

Show All 💌 entries	Show/hide	columns (7 hidd	en)			Filter		1
Subject name	Subject description	Gene hit	Genomic Location	Orientation	Length	Score v	E-val	%ID
SPAC1039.05c.1.pep	pep.known chromosome:ASM294/21:5456674:5459789:-1 gene:SPAC1039.05c transcript:SPAC1039.05c.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol.klf1 description:transcription factor, zf4ungal binuclear cluster type Klf1 [Source:PomBase:Acc:SPAC1039.05c]	<u>kif1</u>	1.5459085-5459326 (Secuence)	Reverse	47 <u>(Sequence)</u>	156	4.9E-14	57.4 (Aligoment)
SPBC1198.04c.1:pep	pep known chromosome:ASM294v2.II:177469.180735-1 gene:SPBC1198.04c transcript:SPBC1198.04c.1 gene:piktype:protein_coding gene_symbol:zas1 description:zinc finger protein, transcription factor Zas1 (predicted) [Source PomBase/Acc:SPBC1198.04c]	<u>zas1</u>	1180307-180512 (Secuence)	Reverse	54 (Sequence)	141	6.1E-12	46.3 (Alianment)
SPAC6F12.02.1.pep	pep.known chromosome:ASM294/211309676:1313429:1 gene:SPAC6F12.02 transcript:SPAC6F12.02.1 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding gene_symbol:st2 description transcription factor Rst2 [Source:PomBase.Acc.SPAC6F12.02]	<u>rst2</u>	1-1311181-1311279 (Secuence)	Forward	33 (Sequence)	129	2.9E-10	66.7 (Aligoment)
SPAC4G8 13c 1 pep	pep.known chromosome ASM294/21.786778.7902191 gene.SPAC4G8.13c transcript:SPAC4G8.13c.1 gene_biotype.protein_coding transcript_biotype:protein_coding	<u>prz1</u>	1.787218-787373 (Sequence)	Reverse	52 [Sequence]	122	2.7E-9	38.5 (Alignment)

2 ábra Páronkénti szekvencia illesztés az S.pombe Rsv1 proteinnel

S.japonicus Sequence ID: Icl|Query_228575 Length: 608 Number of Matches: 1

Range 1	1: 70 to	0 140 Graph	ics		🔻 Next Match	🛦 Previous Match
Score		Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
130 bi	its(32	B) 3e-37	Compositional matrix ad	ust. 56/71(79%)	60/71(84%)	2/71(2%)
Query	1	MKSYECPFO	CKRVFHRQEHQVRHIRSHTGEKI	FECSYPSCKKRFTRR	DELIRHVRTHLRK	A 60
Sbjct	70	MKTYECPIC	CKRIFHRHEHQTRHIRSHTGERI	FACSYPSCTKRFTRR	DELIRHTRTHLRK	A 129
Query	61	L-VTP-EQI	ILD 69 F+D			
Sbjct	130	FQVAPSEG	TVD 140			

S.octosporus

Sequence ID: Icl|Query_240611 Length: 418 Number of Matches: 1

Range 1	: 1 to 1	164 <u>Graphi</u>	<u>cs</u>		1	🛚 Next Match 🔺 🖡	Previous Match
Score		Expect	Method		Identities	Positives	Gaps
197 bit	ts(500) 7e-62	Composition	al matrix adjust.	99/167(59%)	120/167(71%)	3/167(1%)
Query	1	MKSYECPF	CKRVFHRQEHQV	RHIRSHTGEKPFECS	SYPSCKKRFTRRDE	LIRHVRTHLRKA	60
Sbjct	1	MKTYECPY	CRRIFHRQEHQA	RHIRSHTGEKPFVCS	SYFDCRKRFTRRDE	LIRHVRTHLRKA	60
Query	61	LVTPEQTL	DVNLHKAPDSKP	EGDKSTGQEADKSQN	NOSKDGSITDPVO	AVLALSVAYAKP	120
Sbjct	61	LVNPD-AL	SITVEDAPSLPS	TNEESSSNAHAHTPI	DSDSKKPYDPVQ	AVVALSVAYAKP	119
Query	121	TSVSLSPT T+VSL+	DLQAQSKLIEKP D+O OS +P	RRRSASNATGSLNK RR+SASNA L P	NQDPLRRFSISE	167	
Sbjct	120	TTVSLTSQ	DVQIQSLGAARP	RRKSASNAYLLN	NGGSFRRFSVSD	164	

C.albicans

Sequence ID: Icl|Query_241073 Length: 822 Number of Matches: 4

Range	1: 746	to 798 Grap	ohics					Next N	Match	A Previous M	latch
Score 74.3 b	oits(18	Expect 1) 3e-18	Method Compositi	onal mat	rix adjust	Identitie 27/53(5	s 1%)	Positiv 37/53	es (69%)	Gaps 0/53(0%)	
Query	2	KSYECPFC	KRVFHRQEHQ	VRHIRSHT	GEKPFECS	PSCKKRFT	RRDEI	LIRHVR	54		
Sbjct	746	KKHKCPIC	ESRFQRPEHV	KRHLKSHS	SEKPFECQ	IPNCGKRFN	RKDNI	KAHLK	798		

Range	2: 730 t	o 770 Gra	phics	Vext Match	A Previous M	atch 🛕 First Match
Score	oits(60	Expect 0.001	Method Compositional matrix adjust.	Identities 14/43(33%)	Positives 25/43(58%)	Gaps 7/43(16%)
Query	19	QVRHIRS	HIGEKPFECSYPSCKKRFTRRD	ELIRHVRTH 5	6	
Sbjct	730	KVRNNRS	KSNDKSDPKKKHKCPICESRFQRPE	HVKRHLKSH 7	70	

Range	3: 774 t	o 802 Gra	phics		V Next Match	A Previous Ma	atch 🛕 First Match
Score 22.3	bits(46)	Expect 0.056	Method Compositional matrix ad	just.	Identities 9/29(31%)	Positives 17/29(58%)	Gaps 2/29(6%)
Query	2	KSYEC	PFCKRVFHRQEHQVRHIRSHTG	28			
Sbjct	774	KPFECQME	PNCGKRFNRKDNLKAHLKKIHG	802			

Range 4	4: 267 to	287 Gra	phics		V Next Match	A Previous Ma	atch 🛕 First Match
Score		Expect	Method		Identities	Positives	Gaps
16.5 b	oits(31)	3.1	Compositional	matrix adjust.	9/21(43%)	13/21(61%)	0/21(0%)
Query	148	ATGSLNKR	NQDPLRRFSISES	168			
Sbjct	267	ATTAMNKI	MKTPLRGHTRSRS	287			

3. ábra/a Páronkénti szekvencia illesztés az a C2H2 domének között

Query: S. pombe Rsv1 C2H2 Sbjct: S. japonicus Rsv1 C2H2

Sequence ID: Query_48497Length: 53Number of Matches: 1 Related Information Range 1: 1 to 53Graphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect		Method				Ident	ities	Posi	itives	9	Gaps	
96.7 bits(239) 2e-34	Compo	osition	nalmati	rix adju	st. 4	45/53((85%)	47/53	(88%) <mark>0/</mark> :	53(0%)	,
Query 1	YECPFCH	RVFHRQ	EHQVI	RHIRSH	TGEKPF	ECS	SYPSCH	KRFT	RRDEI	IRHV	RTH	53	0
Sbjct 1	YECPICH	RIFHRH	EHQT	RHIRSH	TGERPF	ACS	YPSC	TKRFT	RRDEI	IRHT	RTH	53	

3. ábra/b

Query: S. pombe Rsv1 C2H2 Sbjet: S. octosporus Rsv1 C2H2 Sequence ID: Query 146415Length: 58Number of Matches: 1 **Related Information** Range 1: 1 to 53Graphics Next Match Previous Match Alignment statistics for match #1 Score Method **Identities** Positives Gaps Expect 96.7 bits(239) 3e-34 Compositional matrix adjust. 45/53(85%) 49/53(92%) 0/53(0%) YECPFCKRVFHRQEHQVRHIRSHTGEKPFECSYPSCKKRFTRRDELIRHVRTH 53 Query 1 YECP+C+R+FHRQEHQ RHIRSHTGEKPF CSY C+KRFTRRDELIRHVRTH Sbjct 1 YECPYCRRIFHRQEHQARHIRSHTGEKPFVCSYFDCRKRFTRRDELIRHVRTH 53

3. ábra/c

Query: S. pombe Rsv1 C2H2 Sbjct: C. albicans Cas5 C2H2

Sequence ID: Query_105459Length: 55Number of Matches: 3 Related Information

Range 1: 1 to 51 Graphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Score Expect			Method	Ident	ities	Po	sitives	Gaps	1	
61.2 bits(147) 3e-20	Con	nposit	ional matrix	x adjust.	<mark>26/51(</mark>	<mark>51%)</mark>	36/5	1(70%) 0/51(09	%)
Query 1	YECPFCK	RVFH	IRQEHÇ	VRHIRSHT	GEKPFEC	SYPSCH	KRFT	RRDE	LIRHV	R 51	0
	++CP C+	- F	R EH	RH++SH+	EKPFEC	P+C	KRF	R+D	L H+	+	
Sbjct 1	HKCPICE	SRFC	RPEH	KRHLKSHS	SEKPFEC	QMPNCO	KRFN	RKDN	ILKAHL	K 51	

11. Publikációs lista

Pataki Emese

<u>A dolgozat témájához kapcsolódó, referált, nemzetközi</u> folyóiratban megjelent cikkek:

- 1. Emese Pataki. Matthias Sipiczki, Ida Miklos (2017)Schizosaccharomyces pombe rsv1 Transcription Factor and its Putative Homologues Preserved their Functional Homology and are Evolutionarily Conserved. Microbiology 74: 710. Current doi:10.1007/s00284-017-1227-9. IF: 1,322
- 2. Emese Pataki, Ronit Weisman, Matthias Sipiczki, Ida Miklos (2016) *fhl1* gene of the fission yeast regulates transcription of meiotic genes and nitrogen starvation response, downstream of the TORC1 pathway. *Current Genetics* 63: 91. doi:10.1007/s00294-016-0607-1. IF:3,764

Előadások:

 Pataki E, Sipiczki M és Miklós I (2015) Az *fhl1* gén és a TOR szignáltranszdukciós útvonal kapcsolatának vizsgálata mutáns *S. pombe* törzsek segítségével. A "Biotechnológia a Debreceni Egyetemen" 2. szimpózium, DAB Székház, Debrecen.

- Emese Pataki, Ronit Weisman, Mátyás Sipiczki, Ida Miklós (2015) *Fhl1* controls transcription of the nitrogen starvation induced genes in cooperation with TORC1 in *Schizosaccharomyces pombe*. 17th International Congress, Hungarian Society for Microbiology, An Eötvös Scientific Conference, Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary, July 8-10, 2015. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62 (Suppl), pp. 127–241 (2015) DOI: 10.1556/030.62.2015.Suppl.2.
- Emese Pataki, Ronit Weisman, Matthias Sipiczki, Ida Miklos (2014) Study of the genetic interaction between *fhl1* and *tor1/tor2 S. pombe* genes. EMBO Practical Course- "Molecular genetics with fission yeast" Institut Pasteur, Paris, France, 30 June – 11 July 2014.

Hazai és nemzetközi konferencián bemutatott poszterek:

- Emese Pataki, Mátyás Sipiczki, Ida Miklós (2015) Interspecific complementation analysis between *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. 17th International Congress, Hungarian Society for Microbiology, An Eötvös Scientific Conference, Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary, July 8-10, 2015. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 62 (Suppl), pp. 127–241 (2015) DOI: 10.1556/030.62.2015.Suppl.2.
- 2. Emese Pataki, Ida Miklos, Matthias Sipiczki (2013) Microarray analysis of a forkhead transcription factor of *Schizosaccharomyces pombe*. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely,

Hungary, October 16-18, 2013. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60 (Suppl.), pp. 111–261 (2013) DOI: 10.1556/AMicr.60.2013.Suppl.2.

- Emese Pataki, Matthias Sipiczki, Ida Miklos (2013). *Rsv1* gene has functional homology in the *Schizosaccharomyces species*. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary, October 16-18, 2013. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60 (Suppl.), pp. 111–261 (2013) DOI: 10.1556/AMicr.60.2013.Suppl.2.
- Anett Madar, Emese Pataki, Ida Miklós, I.J. Holb, M. Sipiczki (2012) Conserved transcriptional regulators in the *Schizosaccharomyces* group. Annual Meeting of the Hungarian society for Microbiology, Keszthely, Hungary, 2012. október 24-26.

<u>A doktori dolgozat anyagában nem szerepelő eredmények</u> konferenciaposzterei:

- 1. **Emese Pataki**, Ronit Weisman, Martin Kupiec (2017) Roles of TORC2 in *Schizosaccharomyces pombe*. The Annual Israeli Genome Stability Meeting, Bar Ilan University. 6. April 2017.
- Emese Pataki, Ronit Weisman, Martin Kupiec (2017) Isolation of hyperactive alleles of Gad8 in *Schizosaccharomyces pombe*. ILANIT 2017, Federation of the Israel Societies for Experimental Biology, Eilat, Israel. 20-23. February 2017.