

37. OTDK Biológia Szekció helyi TDK forduló

A többsejtű formák evolúciójának vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae*-ben

Kittlinger Villő

Molekuláris biológiai MSc

II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem



HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet
Számítógépes Rendszerbiológiai Kutatócsoport

Témavezető:

Dr. Sarkadi Zsuzsa
tudományos munkatárs

Tartalomjegyzék

0. Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés	5
1.1. A többsejtű formák megjelenése	5
1.1.1. A fonalas növekedés, mint multicelluláris forma	6
1.1.2. A természetben megtalálható <i>S. cerevisiae</i> törzsek többsejtű fenotípusai	7
1.1.3. A biofilm kolóniák felépítése és működése	8
1.1.4. A különböző kolónia morfológiák lehetséges szerepei	8
1.2. A fonalas növekedést befolyásoló gének	9
1.3. A többsejtű formák klinikai jelentősége	9
1.4. A fonalas növekedés evolúciója <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -ben	10
1.4.1. Evolúciós vizsgálatok <i>Saccharomyces cerevisiae</i> törzsgyűjtemények használatával	11
2. Célkitűzések	13
3. Anyagok és módszerek	14
3.1. Felhasznált törzsek	14
3.2. Az invazív növekedés vizsgálatának módszere	14
3.2.1. A lemezek fotózása és mosása	15
3.2.2. Az invazív növekedés számszerűsítése	16
3.3. A penetrációs mintázatok csoportosítása	17
3.4. Az adatok kiértékelése	18
4. Eredmények	19
4.1. A természetes törzsek invazivitásának vizsgálata	19
4.2. Az invazivitás vizsgálata a törzsek különböző tulajdonságai alapján	21
4.2.1. Az invazív növekedés mértéke a különböző kládokban	21
4.2.2. Az invazív növekedés változása a környezethez alkalmazkodva	22
4.2.3. Az invazivitás összehasonlítása a vad és a domesztikált törzsek között	23
4.2.4. Az invazivitás összehasonlítása az aneuploidok és az euploidok között	24
4.2.5. Az invazív növekedés és a ploidia kapcsolata	25

4.3.	Az invazív növekedés során keletkező penetrációs mintázatok	27
4.3.1.	A domesztikáltság hatása a penetrációs mintázatokra.....	28
4.3.2.	Az ökológiai eredet hatása a penetrációs mintázatokra	28
4.3.3.	Penetrációs mintázatok vizsgálata a filogenetikai hovatartozás kapcsán.....	29
4.3.4.	A ploidia hatása a penetrációs mintázatokra	30
5.	Diszkusszió.....	31
6.	Köszönetnyilvánítás.....	33
7.	Irodalom jegyzék.....	34
8.	Függelék	39

0. Rövidítésjegyzék

DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek elmélet
ECM.....	extracelluláris mátrix
FDR	False Discovery Rate
fMAPK	filamentous Mitogen-Activated Protein Kinase
PenStrep.....	penicillin-sztreptomycin
rpm.....	rounds per minute
SGRP2	<i>Saccharomyces</i> Genome Resequencing Project 2
SNP	single nucleotide polymorphism
Wilcoxon próba.....	Wilcoxon féle előjeles rangpróba
YPD	yeast peptone dextrose (élesztő kivonat, peptone, D-glükóz)

1. Bevezetés

1.1. A többsejtű formák megjelenése

A multicelluláris életformák kialakulása a Földön való élet egyik legnagyobb előrelépése volt. Azzal, hogy egyszerre több sejt dolgozott egy csoportban, megtörténhetett a sejtek differenciálódása, és ezzel együtt a komplexebb életformák megjelenése. A sejtek differenciálódása előtt azonban azonos sejtek tömörülése jelentette a multicelluláris életformát. Ennek kutatására az egyik legjobb modell szervezet a *Saccharomyces cerevisiae*, mivel gyorsan szaporodik és igen rövid a növekedési időtartama. Alapvetően egysejtű életformát mutat, azonban stressz hatására különböző környezetben változatos multicelluláris formák kialakítására képes (Karathia és mtsai, 2011). Így az élesztő fakultatív multicelluláris élőlénynek tekinthető, hiszen mind egysejtű formában, mind többsejtű formában képes életben maradni és funkcionálni, szaporodni.

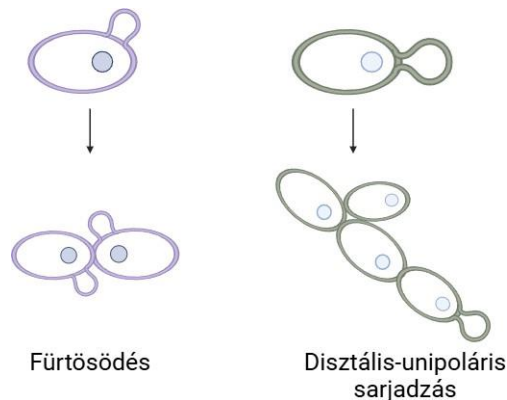
Az élesztők esetében a multicelluláris formák kialakulására két lehetőség is van. Egyik esetben a sejtek közötti tapadási folyamat (sejtadhézió) következtében az élesztő sejtjei aggregálódnak, és ilyenkor flokkuláció, vagy flor képződés történhet (Kuzdzal-Fick és mtsai, 2019). Ezeknek a folyamatoknak igen fontos jelentőségük van a bor és a pezsgő gyártás területein (Legras és mtsai, 2016). Flokkuláció esetében folyadékban belül az élesztők sejt-sejt adhézióval összetapadnak (Goossens & Willaert, 2010), flor képzés esetében pedig egy biofilmet képeznek a sejtek a folyadékoszlop felszínén sejt-sejt adhézióval (Ishigami és mtsai, 2006).

A másik esetben a mitotikus osztódás (sarjadzás) során az anyasejtekről nem válnak le a leánysejtek, majd ezzel hosszú láncokat alkothatnak. Ilyen folyamat a fürtösödés és a fonalas növekedés is. Fürtösödés során a haploid sejtek esetén az axiálisan sarjadzó anyasejtről nem válik le a leánysejt, ami ezután szintén axiális sarjadzással újabb leánysejtet hoz létre. A fonalas növekedésnél a sejtek disztális-unipolárisan sarjadzanak, jellemzően diploid sejtekben, ami egy olyan speciális szaporodási mód, amelynél az új sejtek az anyasejt tengelyével egy vonalban, közvetlenül annak végénél keletkeznek. A fonalas növekedés két lehetséges változata a pszeudohifa képzés és az invazív növekedés. Ezek többnyire szilárd felszínen történnek meg, amikor a telep az alatta elhelyezkedő szilárd felszínbe (pl. agarba) fizikailag behatol (penetrál), és tovább nő azon belül.

Mindegyik esetben a multicelluláris forma kialakítása a tápanyag hiányához köthető: ezek a formák elősegítik, hogy a sejtek tovább maradhassanak életben azután is, hogy a körülmények negatív irányba változnak.

1.1.1. A fonalas növekedés, mint multicelluláris forma

A fonalas növekedés az a folyamat, amely során a sejtek megváltoztatják alakjukat és növényi mintázataikat tápanyag hiány vagy másfajta stressz tényező hatására (Rua és mtsai, 2001). A fonalas növekedés esetén gyakran megfigyelhető a disztális-unipoláris növekedési mintázat, ami egy speciális sarjadzási minta az élesztőknél, ahol az új sejt (sarj) mindig az anyasejt disztális pólusán keletkezik (1. ábra). Ez azt jelenti, hogy az új sarjak mindig ugyanazon az oldalon növekednek, a sejt egyik pólusán, míg a másik pólus inaktív marad. A sejtek alakja ennek során gyakran megnyúlik, és megjelenik ez a mintázat, melynek a végén a leánysejtek nem válnak le az anyasejtről, így hosszú láncokat, fonalakat kialakítva. Így a kolónia vagy az agar felszínén terjeszkedve nő (pseudohifa képzés), vagy az agarba penetrál (invazív növekedés). A disztális-unipoláris növekedés inkább a diploid élesztőkre jellemző.



1. ábra. A fonalas növekedés során megjelenő főbb sejtképzési formák. Az ábra bal oldalán a lilával jelölt törzsek a fürtösödés folyamatát mutatják be, a jobb oldalon pedig zölddel a disztális-unipoláris sarjadzást lehet látni.

Az invazív növekedést hagyományosan haploid törzsek esetében vizsgálják, míg a pseudohifa képzést inkább diploid törzsek esetében. A haploid élesztő törzsek ugyanis az axiális sarjadzási mód miatt nem tudnak egyenes filamentumokat létrehozni, fürtösödve nőnek, míg a diploid törzsek a bipoláris növekedési mintázataik miatt képesek filamentumokat létrehozni (Roberts & Fink, 1994). Azonban mind a diploidok, mind a haploidok képesek pseudohifa képzésre, bár a haploid törzsek filamentjei nem mutatnak szignifikáns terjeszkedést a kolónia kiindulási pontjától, míg a

diploid törzsek igen távolra képesek az agar felszínen elnőni (Gancedo, 2001). Emellett a haploidokhoz hasonlóan a diploidok is képesek penetrálni az agarfelszín alá, hosszú filamentjeik segítségével akár még erősebben is belenőhetnek az agarba, mint a haploid törzsek (Gancedo, 2001).

Az invazív növekedést külön úgy lehet definiálni, mint a filament képződés és az agar penetráció olyan kettőse, melynek eredményeképpen a haploid törzs behatol/belenő az alatta megtalálható agarba (Roberts & Fink, 1994). Az invazív növekedés gyakran megfigyelhető különböző stressz tényezők hatására, mint például nitrogén stressz, aminosav stressz, éhezés eredményeként vagy alkohol jelenlétében (Zupan & Raspor, 2010).

1.1.2. A természetben megtalálható *S. cerevisiae* törzsek többsejtű fenotípusai

A természetben megtalálható, vagy más szóval vad izolátumok változatos multicelluláris formák kialakítására képesek. Képesek flokkok kialakítására, melyek egymáshoz adhézióval tapadó sejtekből állnak. Leggyakrabban folyékony környezetben figyelhető meg, amint „összerögösödnek” és leülepednek a folyadék aljára (Hope & Dunham, 2014). A flokk képzéshez hasonló, de mégis más jellegű többsejtű forma a biofilmképzés jelensége, mely során az élesztő sejtek egy folyadék réteg alján összetapadnak, és vékony élesztőhártyát hoznak létre. A biofilmhez küllemre hasonlító forma a szőnyegképzés (mat formation), mely során a lágy agaron a kolónia szétterül. A szőnyeg maga egy olyan struktúra, mely két részből áll: egy központi, „hub” nevű részből, valamint egy periférián lévő részből, melyet peremnek neveznek (Reynolds és mtsai, 2008). A „hub” részét a szőnyegnek gyakran csatornák és ráncok határolják el a perifériától. Amely kolónia nem növeszt szőnyeget, az rosszul terjedő sejtömegeként fog növekedni (Reynolds és mtsai, 2008). A vad típusú törzsekre szintén jellemző a szilárd felszínekhez való adhézió (Guillemot és mtsai, 2007), amelyet gyakran a kolónia polisztirén műanyag felszínre való kitapadásával vizsgálnak. A kitapadási mechanizmus kétféle képpen történhet: történhet általános, nem specifikus fizikai- kémiai erőknek kitéve, melyet a Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek elmélet (DLVO) elmélet ír le, vagy termodinamikai megközelítéssel, amely a partnerek közötti határfelületi szabad energiák egyensúlyát veszi figyelembe (Guillemot és mtsai, 2007).

1.1.3. A biofilm kolóniák felépítése és működése

A biofilm kolóniák jól védett, összetett rendszerek, ahol a sejtek szoros együttműködésben végzik a kolónia fenntartásához szükséges feladatokat. Több, egymástól elkülöníthető rétegből állnak, amelyek különböző funkciókat látnak el. A külső sejtek egy része különböző multidrog-efflux pumpák (például a Pdr5p és Snq2p) segítségével eltávolítja a toxikus vegyületeket, így védve az egész kolóniát a toxikus anyagok sejtkárosító hatásaitól (Váchová és mtsai, 2011). Ezek a kolóniák kiterjedt extracelluláris mátrixszal (ECM) rendelkeznek, ami egy szelektíven áteresztő anyag, amit a belső sejtek termelnek. Ez nem csak védőréteggént szolgál, hanem tápanyagforrásként is, amely támogatja a belső sejtek túlélését és szaporodását is egyaránt (Váchová és mtsai, 2011). Az élesztő biofilm kolóniákban megfigyelhető a sejtek differenciálódása a kolónia különböző rétegeiben. Ez hasonlít a magasabb rendű élőlények szöveteinek differenciálódásához, ahol a külső sejtek a védelemre, a belső sejtek pedig a növekedésre és szaporodásra specializálódnak (Váchová és mtsai, 2011).

1.1.4. A különböző kolónia morfológiák lehetséges szerepei

A labortörzsek kolóniái a leggyakrabban sima („smooth”) felszínű, és rosszul strukturált morfológiát mutatnak (Kuthan és mtsai, 2003), de a természetben előforduló törzsek között gyakran találunk más fajta morfológiát is. Ezt „fluffy” (bolyhos) növekedési mintának nevezik, mely látszólag nem a kolónián belüli pseudohifa képzéstől alakul ki, sokkal inkább az intercelluláris filamentumok jelenléte miatt (Kuthan és mtsai, 2003). Az intercelluláris filamentumok jelenléte már a fiatal, pelyhes telepekben is arra utal, hogy az ECM, amely összeköti és körülveszi a sejteket, nem az éhezés miatt alakul ki a telepben (Kuthan és mtsai, 2003). Ezeknek köszönhetően a vad törzsek sokkal strukturáltabb és szervezettebb telepeket tudnak létrehozni a „smooth” labortörzsekhez képest, ami a természetben való életben maradáshoz elengedhetetlen. A „fluffy” és „smooth” kolónia morfológiák képesek megváltozni a környezeti hatásoknak megfelelően. A „fluffy” törzsek laborkörülmények között, gazdag táptalajon és állandó hőmérsékleten egy idő után „smooth” fenotípust vesznek fel, mivel a „fluffy” fenotípus kialakítása energiaigényesebb, mint a „smooth” fenotípus kialakítása (Kuthan és mtsai, 2003).

1.2. A fonalas növekedést befolyásoló gének

A *Saccharomyces cerevisiae*-ben a fonalas növekedést több lehetséges útvonal és azok génjei irányítják. Az fMAPK (filamentous Mitogen-Activated Protein Kinase) útvonal szenzor molekulája az Msb2p, melynek aktivációját a kedvezőtlen szénforrásokon való növekedés okozza. A fMAPK útvonal aktiválása után a folyamatot a Cdc42p irányítja, amely egy Rho GTPáz típusú fehérje, majd a folyamat tetőpontja a Kss1p foszforilációja, ami egy MAP kináz típusú fehérje. Ez a fehérje több másik transzkripciós faktort is szabályoz, mint például az Ste12p-t, a Tec1p-t, az Msa1p-t és az Msa2p-t, valamint a represszor Dig1p-t. Ezek a transzkripciós faktorok olyan, a fonalas növekedésben fontos szerepet játszó géneket regulálnak, mint a *FLO11* vagy a *FLO8*, és ezek mind a pszeudohifa képzést és az invazív növekedést is (Chow és mtsai, 2019). Egy másik útvonal, ami szintén befolyásolhatja ezeket a folyamatokat az a RAS (Ras-cAMP-PKA) útvonal, amelyen belül a fontosabb gének által kódolt fehérjék a Ras2p, Tpkp, Tpk2p, valamint az ezek által aktivált Flo8p (Chow és mtsai, 2019). A Ras2p mind a fonalas növekedéshez kapcsolódó MAPK, mind a PKA útvonalak mellett működik, melyből utóbbi a sejt egyik fontos jelátviteli útvonala (Shively és mtsai, 2013).

Ezekon kívül még számos más gén és fehérje is szerepet játszik a fonalas növekedés kialakításában. Egyes gének a sejtek megnyújtásában játszanak szerepet, amely fontos tényezője a fonalas növekedésnek (pl. *PEA2*, *HSL7*), más gének pedig a sarjadzási mintázat megváltozásában segédkezhetnek (pl. *BUD8*, *BUD4*) (Chow és mtsai, 2019). Az egyik legfontosabb gén a *MUC1/FLO11*, ami a sejt-sejt adhéziók kialakításában játszik szerepet (Jin és mtsai, 2008) (ez a gén a fonalas növekedés kialakítása mellett szerepet játszik az élesztők ivaros szaporodásában is). Egyes, a fonalas növekedésben szerepet játszó géneket *Candida* ortológok alapján azonosították, például az *MNN10*, *ALG8*, *SPT8*, *MIG2*, *ALG9* és *PEX3* géneket (Chow és mtsai, 2019).

1.3. A többsejtű formák klinikai jelentősége

A fonalas növekedés nem csak a *S. cerevisiae*-ben megfigyelhető jelenség, hanem más élesztő fajokban is előfordulhat, mint például a *Candida* fajokban, ahol virulencia faktornak is számít (Lim és mtsai, 2012). A *Candida* fajok szintén az élesztőgombák közé tartoznak, és a körülbelül 150 eddig ismert fajuk között találunk több olyat is, mely humán patogén. A *Candida* fajok opportunisták

patogének, rendszeresen okoznak betegségeket legyengült immunrendszerű és immundefektusban szenvedő személyekben (Lim és mtsai, 2012). A világon a legelterjedtebb oportunista humán patogén faj a *Candida albicans*, mely könnyen okozhat *C. albicans* kandidiózist (Lim és mtsai, 2012), valamint nozokomális véráram fertőzést (Warenda és mtsai, 2003). A *C. albicans* esetében a hifa képzés megnöveli a lehetőséget a szövetekbe való penetrációra. A gomba fertőzésének hatásait egerekben vizsgálták a véráramba való beinjektálással, és kimutatták, hogy 5 nap elteltével már látványos *C. albicans* szöveti behatolást lehet látni az egerek veséjében (Warenda és mtsai, 2003.)

Emellett már a *S. cerevisiae* törzsekről is egyre több olyan feljegyzést lehet találni, ami mutatja, hogy aktívan károsak lehetnek az emberi egészségre (Zupan & Raspor, 2010). Egyes, probiotikus törzsekről kimutatták, hogy humán szisztémás fertőzéseket okozhatnak (de Llanos és mtsai, 2006).

A biofilm képzés szintén egy nagyon fontos virulencia faktora a *C. albicans* esetében. A biofilmek összetett struktúrájuk révén megnehezítik a szisztémás fertőzések kezelését, mivel ellenállóbbak mind a gombaellenes kezelésekkel, mind az immunrendszer válaszaival szemben. Ezen túlmenően gyakran okozzák a beültetett orvosi eszközök hamarabbi elévülését, például megtelepednek a katétereken és a szívbillentyűkön, mivel ezek ideális felületet biztosítanak a biofilmek megtapadásához és kialakulásához (Lim és mtsai, 2012).

1.4. A fonalas növekedés evolúciója *Saccharomyces cerevisiae*-ben

Az egyszerűbb gombák fejlett érzékelési rendszereket alakítottak ki, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy reagáljanak a környezet változásaira. Ezek a rendszerek aktiválják azokat a folyamatokat, amelyek összehangoltan megváltoztatják a sejtek működését, alakját és tapadását. Amikor a tápanyagok mennyisége túlságosan lecsökken, gyakran növekedési szünetet tartanak, spórákat képezve, amelyek ellenállnak a különféle környezeti stresszeknek. Ezzel szemben egy másik lehetséges válasz a fonalas növekedésre való áttérés, amelyben a sejtek elágazó láncai vagy hifái micéliummá állnak össze (Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004).

A fonalas növekedésnek a gomba szempontjából sok előnye van, hiszen az elágazó fonalak lehetővé teszik a környezet szélesebb felfedezését alacsonyabb energia költséggel, mint a nem fonalas növekedés. A sejtek közötti tapadás és a rendkívül polarizált növekedés elősegíti az aljzatba

való behatolást. Ezenkívül a fonalak magas felület-térfogat aránya megkönnyítheti a tápanyagok szállítását (Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004).

1.4.1. Evolúciós vizsgálatok *Saccharomyces cerevisiae* törzsgyűjtemények használatával

Az élesztő evolúciójának vizsgálatához a világ különböző területeiről, és változatos életterekből nagyszámú élesztőtörzset izoláltak, amiket több, változatos összetételű törzskollekcióba összesítettek. Az élesztő kollekciók használata az evolúciós kísérletekben számos előnnyel jár. Többek között az élesztő kollekciók különböző törzseket tartalmaznak, amelyek genetikailag változatosak. Ez lehetővé teszi a kutatók számára, hogy tanulmányozzák a genetikai változások hatásait a fejlődésre. Ezen kívül az egyes kollekciók akár ugyanazon törzsek haploid és diploid verzióit is tartalmazhatják (pl. a *Saccharomyces* Genome Resequencing Project 2. kollekciója, SGRP SET 2), ami megkönnyíti ezeknek az összehasonlítását. De akár az élesztő kollekciók lehetővé tehetik az evolúciós mechanizmusok, például a természetes szelekció és a genetikai drift megfigyelését és modellezését.

1.4.1.1. Az 1011 kollekció

Az 1011 kollekció egy 1011 *Saccharomyces cerevisiae* törzsből álló gyűjtemény, mely törzsek jelentős részét Jackson Peter és társai szekvenáltak meg Illumina párosított végű technikával (Peter és mtsai, 2018). A törzsek a világ különböző részeiről származnak, ezáltal változatos környezeti tényezőknek voltak kitéve izolálásuk előtt, amely eredményeként egy igen átfogó képet biztosítanak a *S. cerevisiae* törzsek evolúciós és ökológiai eredetéről. Többek között találhatunk törzseket Ázsiából, Európából, Brazíliából és Afrikából, valamint a törzsek listája tartalmaz mintákat pékségekből, gyárakból, erdőkből és az emberi szervezetből is (Peter és mtsai, 2018). Az egyes mintákhoz tartozó leolvasásokat az S288C referencia genomra térképezték rá illetve illesztették össze. Összesen 1 625 809 referencia-alapú egy nukleotid polimorfizmust (single nucleotide polymorphism, SNP) detektáltak, melyek hozzájárulnak az izolátumok változatosságához. A SNP-ket felhasználva a törzsekhez egy filogenetikai fát is készítettek, melyen végül 26 csoportot, úgynevezett kládot különítettek el, valamint három mozaik csoportot is

azonosítottak. Ezen kívül a kládok ökológiai eredetét is vizsgálták, és ezek alapján négy csoportot különítettek el: domesztikált, vad, emberi származású, vagy ismeretlen eredetű. A kutatások során azt is sikerült megállapítaniuk, hogy valószínűsíthetően Kelet-Ázsia lehet a *S. cerevisiae* földrajzi eredete. Erre a nemrégiben felfedezett, nagymértékben eltérő vadon élő kínai törzsek engednek következtetni (Peter és mtsai, 2018).

1.4.1.2. Az SGRP SET 2 kollekció

A Saccharomyces Genome Resequencing Project (SGRP) egy kutatási projekt, amelynek célja a *Saccharomyces cerevisiae*, vagyis a közönséges sörélesztő genomjának részletesebb megismerése volt. A projekt Richard Durbin csoportja (Wellcome Trust Sanger Institute) és Prof. Ed Louis csoportja (Nottinghami Egyetem Genetikai Intézete) közötti együttműködés volt (Carter, 2008). A projekt célja a genetikai diverzitás feltárása ezen élesztőgomba faj különböző törzseiben, beleértve a természetes populációkat és az ipari felhasználásra szánt törzseket is. Az eredeti SGRP kollekció egyszerre tartalmaz *S. cerevisiae* és *S. paradoxus* törzseket, az SGRP 2 és 3 azonban már csak külön tartalmazza az egyes fajokat.

Az S288c és W303 stabil haploid laboratóriumi törzsek kivételével, ezek a törzsek monosporikus származékai a 36 *S. cerevisiae* törzsnek, amelyeket az SGRP konzorcium különböző mélységű lefedettséggel szekvenált. A törzsek mind uracil auxotrófok, amelyeket egy 6 bázispár hosszú vonalkóddal jelöltek meg. Ezeket a vonalkódokat különböző restrikciós enzimek ismerik fel, ami megkönnyíti az azonosítást. A legtöbb törzsnél elérhetőek stabil haploid (Mat a és Mat α) és diploid (Mat a/ α) változatok, amelyekből a párosodási típus váltásért felelős homotallikus endonukleáz gént (*HO*) eltávolították.

Ez a projekt fontos, mert hozzájárult a *Saccharomyces cerevisiae* genomjának részletesebb megismeréséhez, és elősegítette az élesztőgombák evolúciós történetének és ipari jelentőségének jobb megértését is. Az eredmények értékes információkat nyújtanak a biotechnológiai alkalmazások számára, különösen az élelmiszer- és italiparban, valamint a gyógyszeriparban.

2. Célkitűzések

A *Saccharomyces cerevisiae* invazív növekedése egy többek által kutatott téma, de a mai napig vannak olyan részei, amikre nem feltétlen tudjuk a választ. Emiatt ebben a dolgozatban megpróbálunk választ találni a *S. cerevisiae* invazív növekedésének körülményeire és részletire, hogy pontosabb képet kaphassunk ezekről a morfológiai képletekről. Terveink között szerepel I. a *S. cerevisiae* invazív növekedése és a filogenetikai hovatartozás közti kapcsolatok megfigyelése, II. a háziasítás vizsgálata az invazív növekedés függvényében, III. az ökológiai környezet szerepének vizsgálata az invazív növekedésre, IV. a ploidia hatása az élesztő törzsek invazivitására és V. a penetrációs mintázatok vizsgálata.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált törzsek

A kísérletek elvégzéséhez két különböző törzskollekciót is felhasználtunk. Az első a 1011 *Saccharomyces cerevisiae* törzsből álló gyűjtemény. A bevezetőben taglalt változatos élesztőtörzsek miatt a különböző törzsek más-más környezeti hatásokra egyedi módon reagálnak, ezért is választottuk kísérletünkhöz ezt a gyűjteményt. A másik gyűjtemény pedig egy 36 törzsből álló SGRP SET 2 kollekció. Mindkét kollekciót már több különböző vizsgálatnak alávetették, ebben a kísérletben pedig az invazivitásukat teszteltük (De Chiara és mtsai, 2022; Peter és mtsai, 2018).

3.2. Az invazív növekedés vizsgálatának módszere

Az invazív növekedés nagy-áteresztőképesű módszerét Farkas és munkatársai fejlesztették ki (Farkas és mtsai, 2022).

Az élesztő izolátumokat -80 °C-os fagyasztóban tároltuk a kioltásukig, amikor is 100 µl YPD (yeast peptone dextrose) tápoldatba oltottuk le kézi újrasztírozható, 96 fém tűből álló átoltó eszköz (pintool) segítségével. A tápoldat tartalmazott 1 % élesztőkivonatot, 2 % peptont, valamint szintén 2 % glükózt tartalmazott. Ezek mellett a tápoldatot a bakteriális fertőzések elkerülése végett 1 % Pen-Strep-pel (Capricorn scientific) egészítettük ki, ami penicillin G és streptomycin keveréke. A sejteket 96 lyukú mikrotiter lemezekben növesztettük két napig. Ez idő alatt 30 °C hőmérsékleten inkubáltuk őket egy Incubator 1000 fűtőmodulban, és 1050 rpm-en ráztuk őket egy Titramax 1000 rezgőlapos rázó segítségével (a rázó amplitúdója 1,5 mm).

A két nap eltelté után a törzseket frissen öntött négyszögletű YPD-agar lemezekre oltottuk ki. A lemezekbe aznap készített, tápanyagban gazdag, szilárdító anyagot (3 % agart) és 1 % Pen-Strep- et tartalmazó YPD táptalajt mértünk ki (35 ml lemezenként). Ezekre a lemezekre ~1-2 µl élesztőkultúrát juttattunk ki minden egyes vizsgált törzsből egy automatizált folyadékkezelő munkaállomásban (Hamilton Microlab STAR robot) egy lebegő tűs pintool segítségével. Ennek a robotnak a használatára a rendszer gyorsasága és pontossága miatt volt szükség, mivel munkája pontosabb, mintha kézi pintool-t használtunk volna. A robotos átoltás után a lemezeket egy folyadékköpenyes inkubátorban (Shel Lab SCP6AD) 6 napon keresztül növesztettük 30 °C-on.

Minden vizsgált törzsből négy replikátumot készítettünk. A mikrotiter lemezek keretére (a legkülső oszlopokra és sorokra) egy laboratóriumi élesztőtörzset helyeztünk, amely pozíciókat a

lemez széli hatása miatt nem használtunk az analízis során, mivel a négyszögletű YPD-agar lemez szélein növező törzsek a többi törzsnél nagyobbra tudnak nőni, ami miatt, hogy a környéken lévő tápanyagokat nem minden irányból veszik el szomszédos telepek. A lemezek keretére a BY4741 genetikai háttér alap törzsét oltottuk ki, ami egy haploid, Mata törzs, mely az S288C törzsből származik. Ezen kívül az egyéb szisztematikus lemez-hatások kiszűrésére miatt minden lemezen elhelyeztünk kontroll törzseket is (1. táblázat). Ezek közül az L5684 egy olyan haploid Mata törzs, ami a Σ 1278b törzsből származik, ennek a diploid párja az L5366, ami szintén az alap Σ 1278b törzs egyik leszármazottja. Az L5684 törzset használtuk pozitív kontrollnak, mivel korábbi cikkekből kiderült, hogy magas szintű invazivitást mutat (Cullen & Sprague, 2000). Negatív kontrollnak pedig a BY4741 és BY4743 genetikai háttér alap törzseit használtuk, amelyek az S288C háttérből származnak, és a Σ 1278b törzshöz képest polimorfizmus mutatnak a *FLO8* génben: egy recesszív funkcióvesztést okozó nonsense mutációt hordoznak, amelynek hatására ezen törzsek nem mutatnak sem fonalas növekedést, sem invazív növekedést (Liu és mtsai, 1996). A BY4741, kereten is elhelyezett Mata törzs diploid változata a BY4743. A kontrollok mellett minden mikrotiter lemezen 52 törzs volt az 1011 kollekciónak, amelynek eredményeként 22 lemezt hoztunk létre és vizsgáltunk a továbbiakban.

Törzs neve	Háttér	Genotípus	Ploidia	Felhasználás	Referencia
BY4741	S288C	Mat A, his3 Δ 0, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0	1	keret, negatív kontroll	Liu és mtsai, 1996
BY4743	S288C	Mat A/ α , his3 Δ 0, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, lys2 Δ 0	2	negatív kontroll	Liu és mtsai, 1996
L5684	Σ 1278b	Mat A, ura3-52, leu2::hisG	1	pozitív kontroll	Cullen & Sprague, 2000
L5366	Σ 1278b	Mat A/ α , ura3-52, leu2::hisG	2	pozitív kontroll	Cullen & Sprague, 2000

1. táblázat. A táblázat a kísérletek során használt kontroll törzsek genetikai hátterének leírását tartalmazza.

3.2.1. A lemezek fotózása és mosása

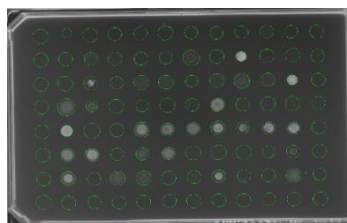
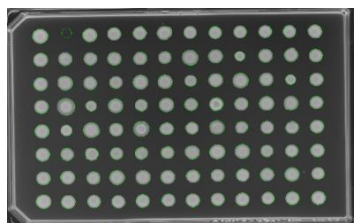
A lemezeket 5 napos inkubációt követően egy Canon EOS M50 kamera segítségével alulról megvilágítva fotóztuk le, a későbbi kiértékelések során ezek a képek voltak a 'mosás előtti' képek. Fotózás után lemestük róluk a felső sejtréteget az első mosás keretein belül. Ehhez először 10-10

ml desztillált vizet mértünk mindegyik lemezre, majd egy Titramax 101 rezgőlapos rázaton 5 percig 700-750 rpm-mel (a rázató amplitúdója 3 mm) előlazítottuk a képződött kolóniákat, amely megkönnyítette a későbbi mosási lépéseket. Ezután mindegyik lemezt egyesével egy körülbelül 60 ml/s-os desztillált vizes vízszög alá helyeztük, majd a lemez minden pontját egyenletes ideig mostuk hozzávetőlegesen öt percen keresztül. A mosás után egy papírtörölő segítségével felitattuk a lemezben maradt felesleges vízcseppeket, és végül 20 percig hagytuk őket száradni. Miután minden lemezzel elvégeztük ezt a folyamatot, lefotóztuk őket még egyszer, ezek a képek voltak végül a 'mosás utáni, eredeti' képek. A fotózás után a lemezeket visszahelyeztük az inkubátorba 30 °C-ra, ahol egy éjszakán át növesztettük őket tovább, hogy az esetlegesen agarba penetrált törzsek tovább növekedhessenek még. A következő nap a lemezeket kivettük, és szintén desztillált vizes vízszög alatt lemostuk őket, itt viszont alkalmaztunk egy dörzsöléses ('rubbing') technikát, ami során óvatosan gumikesztyűs ujjal eltávolítottuk még a maradék, az agar felszínén maradt sejtet, ezáltal biztosítva, hogy csak az agarba penetrált sejteket vizsgálhassuk. A lemezeket ezután az előző naphoz hasonlóan papírtörölővel áttöröltük, majd 20 percen keresztül szárítottuk. Ezután pedig elkészítettük a harmadik képet, az eredmények kiértékelésénél ezek a lemezek voltak az 'mosás utáni, rubbing' képek.

3.2.2. Az invazív növekedés számszerűsítése

A telepeket alulról világítottuk meg fotózásuk során, hogy jobb képet kaphassunk az általuk hagyott lenyomatokról. Az adatok kiértékeléséhez egy, erre a célra kifejlesztett képelemző scriptet alkalmaztunk MATLAB programozói környezetben megírva (Farkas és mtsai, 2022). A program az egyes telepeket mosás előtti és utáni pixel intenzitásait hasonlította össze, melyeknek az arányából ezután kiszámolja az invazivitási pontszámot.

A program szegmentálta az objektumokat, majd eliminálta az agar táptalajból származó zajt azáltal, hogy kivonta a telepek pixelintenzitásából a háttér (táptalaj) pixelintenzitását (2. ábra). Ezt követően az invazivitási pontszámot az alábbi módon számoltuk ki: mosás utáni pixelintenzitás / mosás előtti pixelintenzitás. A relatív invazivitást ezt követően úgy kaptuk meg, hogy a törzsek invazivitási pontszámát a pozitív kontrollként használt törzsek invazivitásával normáltuk le.

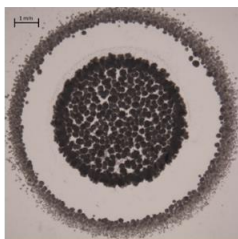


2. ábra. Invazivitás vizsgálata. A program által szegmentált objektumok a 'mosás előtti' és a 'mosás utáni, rubbing' képen. A program ezután ezeknek a szegmentált objektumoknak a pixelintenzitása alapján határozza meg az invazivitás mértékét.

3.3. A penetrációs mintázatok csoportosítása

Az agarba penetráló törzseket általunk meghatározott tulajdonságok alapján csoportosítottuk. Ezek alapján megfigyeltük az egyes kolónia lenyomatoknál a középső kolóniarész meglétét, a külső karima megjelenését és vastagságát, a szektorok előfordulását, a belső sejtmentes gyűrű meglétét, a gyűrűk számát és a megjelenő „szigetek” sűrűségét (3. ábra).

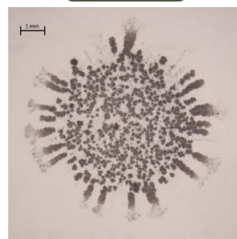
belső sejtmentes gyűrű és gyűrűk



UWOPS03-429.1

Bertam pálma nektár

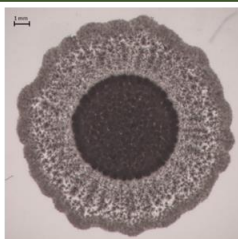
Szektorok



Y12_1b

Pálma bor

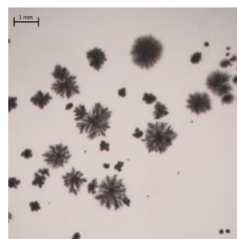
Gyűrűs telep szektorokkal és középső kolónia területtel



UCD_40-49

Citrusok fermentációja

Szigetek



CLIB415

Fermentált ital

3. ábra. Példák a penetrációs mintázatokra. Az ábrán kiemelve lehet látni a belső sejtmentes gyűrűt, a középső kolóniarészt, a szigeteket, a szektorokat és gyűrűket. A méretskála 1mm. A fotók alatt a törzsek neve illetve az izolálás helye látható.

Az elemzést szabad szemmel végeztük az 'mosás utáni, rubbing' képek alapján. A középső kolóniarész és a belső sejtmentes gyűrű megjelenését bináris változóként jelöltük (nincs jelen: 0,

jelen volt: 1). A karima méretét, a szigetek sűrűségét és a szektorok megjelenését egy egytől ötig terjedő skálán pontoztuk. A rétegek számához pedig az egyes telepek gyűrűinek tényleges számát rendeltük hozzá.



4. ábra. Penetrációs struktúrák sematikus rajza. Az ábrán két példán mutattuk be az általunk talált fontosabb penetrációs struktúrákat. Az ábra bal felén lévő példa lenyomaton a középső kolóniarészt, a karimát és a szektorokat lehet látni, ez egy 4 gyűrűs struktúra. Az ábra jobb oldalán pedig a középső kolóniarészt, a belső sejtmintes gyűrűt, a szigeteket és a karimát lehet látni, ez egy 3 gyűrűs struktúra.

3.4. Az adatok kiértékelése

Az adatok kiértékeléséhez az RStudio szoftvert használtuk, amely az R program nyelvet használja (R: The R Project for Statistical Computing, 2001) egy integrált fejlesztői környezetben (IDE).

4. Eredmények

4.1. A természetes törzsek invazivitásának vizsgálata

Az élesztők evolúciója során azok invazív növekedésében létrejött természetes variancia felderítéséhez megmértük az 1011 *S. cerevisiae* törzsgyűjtemény invazív növekedését agar-lemosásos módszerrel (lásd Anyagok és módszerek 3.2). A kísérletet követően első lépésként a törzseket két külön csoportra osztottuk: invazív, illetve nem invazív törzsek. Ehhez az invazivitás mértékének eloszlását vettük alapul a vizsgált törzsek között, amely során azt tapasztaltuk, hogy a törzsek között jelentős eltérések vannak: egyesek kis, míg mások nagy invazivitással rendelkeznek. A kismértékű invazivitást mutató törzsek esetében célunk az volt, hogy meghatározzunk egy alsó határt (5. ábra).

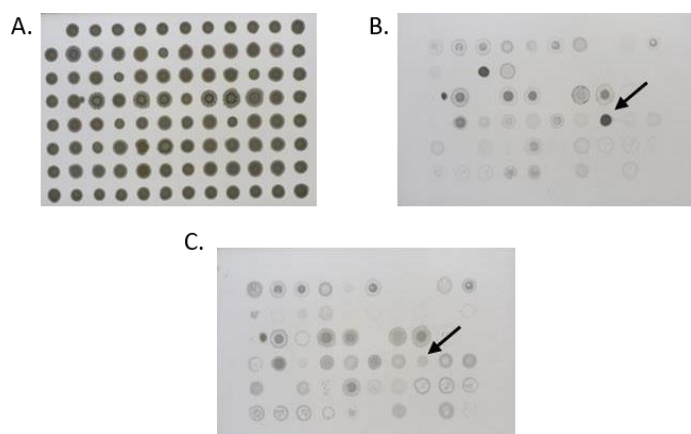


5. ábra. Invazitás az 1011 kollekcióban. A hisztogram x tengelyén az invazitás mértéke látható, az y tengelyen pedig a törzsek száma. A sötétkék szaggatott vonal az invazitás alsó határát jelöli: felette a törzsek invazívnak, alatta pedig nem invazívnak tekinthetők. Ezt a határt a lemosott lemezeken megfigyelhető, szemmel még látható

törzsek invazivitási értéke alapján validáltuk.

Azok a törzsek, amelyek ezen a határon felül helyezkednek el, invazívnak tekinthetők, míg az alatta lévők nem invazívak. Ezt a határt a szabad szemmel látható, penetráló sejtek jelenléte alapján állapítottuk meg. A törzsek akkor minősíthetők invazívnak, ha medián invazivitási pontszámuk (median invasivity score) (a négy replikátumból számolt medián érték) meghaladja a 0,01-et, és szignifikánsan magasabb, mint a negatív kontrollként használt laboratóriumi BY4741 törzse (Wilcoxon teszt, $p < 0,05$, többszörös szignifikancia tesztelésre korrigálva [FDR]). Ez alapján azt találtuk, hogy a vizsgált törzsek körülbelül két harmada invazív ($N = 732$).

Azt figyeltük meg, hogy a legtöbb törzs agar felszín feletti részeit könnyen le lehet mosni, ezzel szemben vannak olyan törzsek, amelyeknél csak dörzsöléssel lehet a felszín feletti kolóniát eltávolítani. Ilyen például a $\Sigma 1278b$ haploid törzs, aminél ismert, hogy a *Flo11p* adhezin szükséges az agarhoz való tapadáshoz (Liu és mtsai, 1996). Annak érdekében, hogy kimutassuk, mely törzsek képesek az agar felszínéhez tapadni, és abba behatolni, összehasonlítottuk az 'mosás utáni, eredeti' és az 'mosás utáni, rubbing' képek invazivitását. A dörzsöléses technika azért volt előnyös, mert az agarhoz való tapadáshoz szükséges gének, mint például a *FLO11* jelenlétét is tudtuk vele tesztelni. Azok a törzsek, amelyek az első mosás után nagyobb invazivitást mutattak, mint a második mosás után, hajlamosabbak volt az agar felszínéhez tapadni, mint abba behatolni. Erre az egyik jó példa a haploid $\Sigma 1278b$, amely az első mosás után nagyobb pixelintenzitást mutatott az elemzés során, mint a második mosás után. Az ábrán ezt nyíllal jelöltük (6. ábra). Ez a törzs egy ismert, korábban leírt invazív törzs, amit végül pozitív kontrollnak is használtunk.



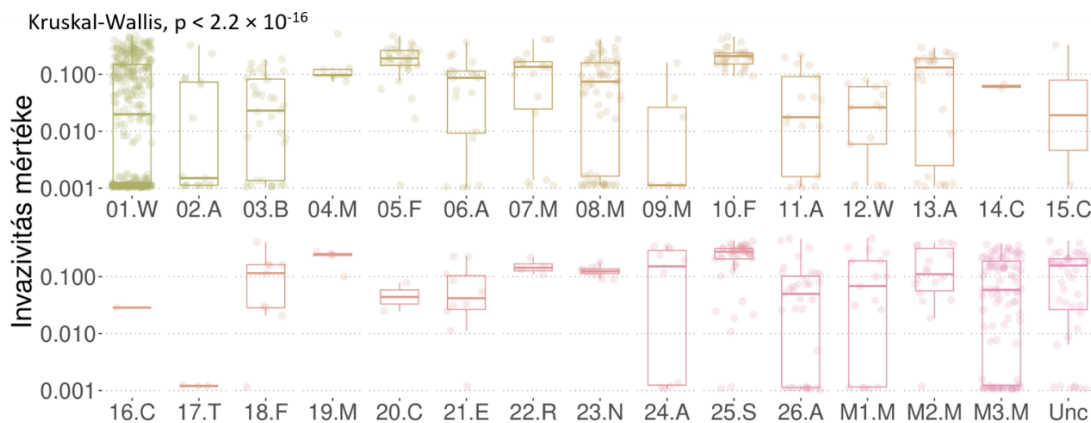
6. ábra. A lemezek a mosások előtt és után. Az „A” képen még a mosás előtti, 'mosás előtti' kép, a „B” kép az első 'mosás utáni, eredeti' kép, a „C” kép pedig a második mosás utáni, 'mosás utáni, rubbing' kép látható. A harmadik képen több sejt látható, am ami azért van, mert ezeket a lemezeket a fotózás előtt egy éjszakára visszatettük az inkubátorba.

A lemezeket az első mosási lépést követően tovább inkubáltuk 30 °C-on egy éjszakán keresztül. Az első mosás során látható volt, hogy melyek azok a sejtek, amelyek az adhezinek hatása miatt nem mosódtak le. A további éjszakai inkubáció célja, hogy azok a sejtek, melyek penetráltak az agarba, tovább tudjanak nőni. A másnapi, dörzsöléses módszerrel lemosott képeken ezért az esetek többségében több sejt látható, mint az első mosás utáni képeken.

4.2. Az invazivitás vizsgálata a törzsek különböző tulajdonságai alapján

4.2.1. Az invazív növekedés mértéke a különböző kládokban.

Az 1011 kollekcióban összegyűjtött törzsek 30 kládba sorolhatók be (ezek közül egy csoport van az ismeretlen eredetű törzseknek, „Unc”). Azt vártuk, hogy az egyes kládokban eredettől függően más lesz az invazivitás mértéke. Ehhez Kruskal-Wallis tesztet végeztünk el, amelynek eredményeként szignifikáns heterogenitás volt megfigyelhető a kládok invazivitása között ($p < 2.2 \times 10^{-16}$, 7. ábra).

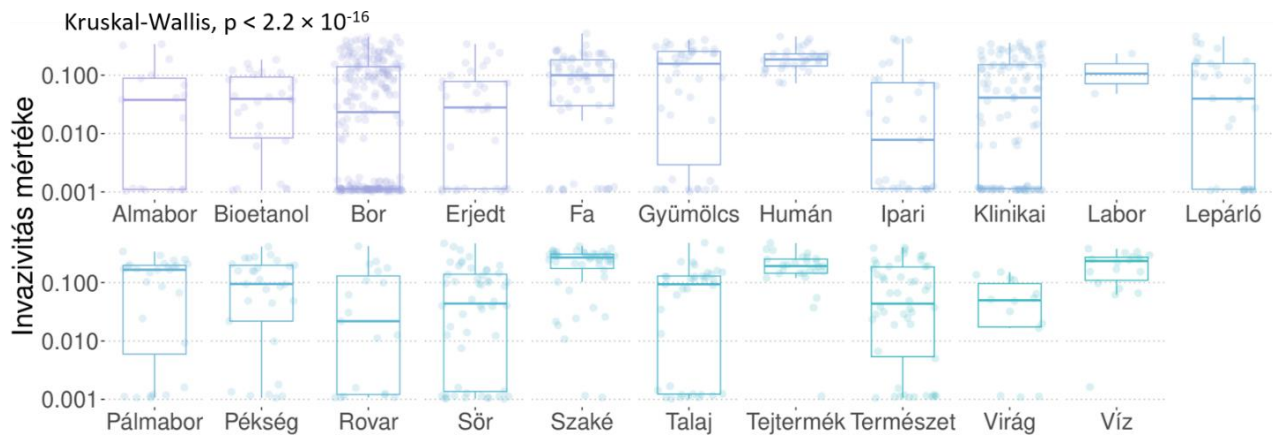


7. ábra. Az invazivitás mértéke az egyes kládokban. Az x tengelyen a kládok rövidített nevei, az y tengelyen pedig az invazivitás mértéke látható. A kládok teljes nevét a rövidítésekkel együtt a függelékben lehet megtalálni.

Az invazivitás mértéke jelentősen magasabb az olyan kládokban, mint például az 5. French dairy (főleg camembert sajtokból származó élesztőt tartalmaz), 10. French Guiana human (a minták többsége emberi ürülékből származik), 19. Malaysian (*Eugeissona tristis* nektárjából izolált mintákat tartalmaz) és a 25. Sake (főleg szakéből kivont élesztők). Ehhez képest van olyan klád, ahol egyértelműen alacsonyabb medián invazivitás volt jellemző, mint például a 17. Taiwanese kládban (ahol főként talajból származó minták vannak). Ezek mellett azonban azt is meg lehet figyelni, hogy a legtöbb klád esetén a törzsek nagy szórást mutatnak a kládokon belül is (6. ábra). A kládok közötti különbségek mögött legalább két lehetséges magyarázat lehet. Az egyik lehetséges magyarázat az az, hogy az invazivitás nem egyszer, hanem többször, egymástól függetlenül alakult ki (a törzsek számozása mutatja, hogy a filogenetikai fán mennyire állnak közel egymáshoz), és ahol kialakult, ott sem minden törzs rendelkezik vele. A másik lehetséges magyarázat pedig az, hogy a *S. cerevisiae* ősi törzs eleve invazív volt, majd az evolúció során bizonyos vonalak valamilyen evolúciós folyamat hatására elvesztették ezt a képességet.

4.2.2. Az invazív növekedés változása a környezethez alkalmazkodva

Az általunk használt törzsek a világ több pontjáról, sok különböző ökológiai környezetből származnak. Felmerül a kérdés, hogy esetleg az élesztők evolúciója során a környezethez való alkalmazkodás milyen hatással van az invazivitásra. A különböző ökológia eredetű törzsek invazivitását Kruskal-Wallis tesztel hasonlítottuk össze, amely során szignifikáns heterogenitást tapasztaltunk ($p < 2.2 \times 10^{-16}$, 8. ábra). A teszt eredménye azt sugallja, hogy az ökológiai eredet befolyásolja az invazivitas mértékét. A leginvazívabb csoportok ezek alapján a Tejtermék, Humán, Szaké és Víz.



8. ábra. Különböző ökológiai környezetből származó törzsek invazivitása. Az x tengelyen az egyes csoportokat lehet látni, az y tengelyen pedig az invazivitas mértékét.

Az eredményeket azonban befolyásolhatja, hogy a Tejtermékekből származó minták többnyire az 5. French dairy kládba tartoznak, az Humán minták a 10. French Guiana human kládba, a Szaké minták pedig a 25. Sake kládba. Ezek alapján nem lehet egyértelműen meghatározni, hogy a környezeti tulajdonságok miatt invazívabbak ezek a törzsek, vagy pedig a filogenetikai fán való elhelyezkedésük miatt. Azonban sejthetjük, hogy itt főként a környezeti viszonyok játszanak nagyobb szerepet, mivel ezek a kládok a filogenetikai fán igen messze találhatók egymástól, ami arra utal, hogy az invazivitas, mint tulajdonság egymás után többször is kialakult egy bizonyos természeti hatásra válaszként.

A Víz minták azonban nem csak egy kládban találhatók meg, hanem nagyon sokrétű eredettel rendelkeznek, így méltán lehet állítani, hogy ebben az esetben a magas invazivitas oka az ökológiai környezethez való alkalmazkodásban keresendő. Ebben a csoportban különböző vízi forrásokból

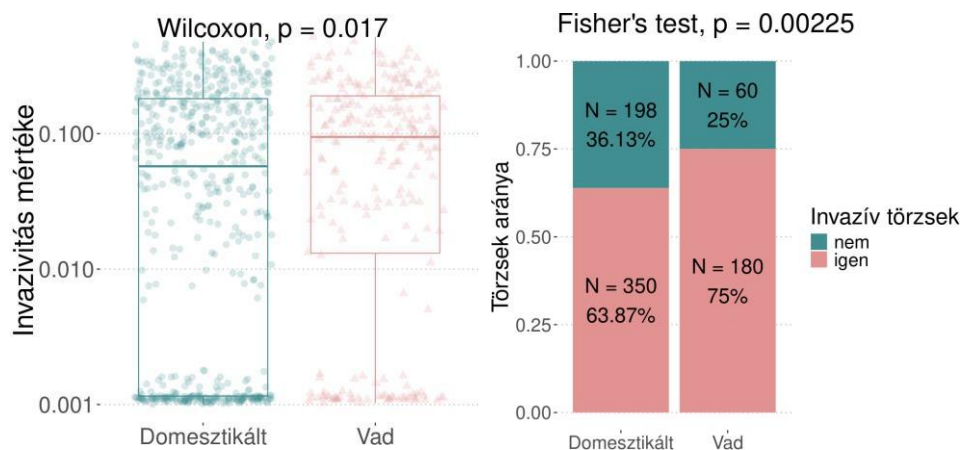
gyűjtöttek össze élesztő izolátumokat, például tengervízből, folyókból (Duna, Morva), halastóból, valamint tiszta és szennyezett forrásokból is.

Itt is meg lehet figyelni, mint a kládok esetében, hogy azok az ökológia csoportok, ahol nem kiemelkedően magas a medián invazivitás, ott általában jelentős mértékű szórást lehet felfedezni a törzsek között. Ez valószínűsíti, hogy az invazivitás és a környezet nem feltétlenül áll szoros kapcsolatban, vagy az egyes csoportok olyan diverzek, hogy kisebb alcsoportokra kéne osztani őket, hogy valódi hatást figyelhessünk meg populációs szinten is. A kisebb csoportokra bontás azonban ennyire változatos körülmények között megtalálható törzsek között nem könnyű, hiszen véges sok alcsoport létrehozását igényelné a feladat, amiket rendszerezni bonyolult lenne.

4.2.3. Az invazivitás összehasonlítása a vad és a domesztikált törzsek között

Az 1011 kollekció tartalmaz olyan törzseket, amik a természetből származnak, ezek a vad izolátumok, és tartalmaz olyanokat is, amiket valahol a múltban „házasítottak” (domesztikáltak), például sörgyártásban, szaké készítésben vagy esetleg pékségekben, és még sok más helyen. Ezekre a törzsekre különböző evolúciós hatások érvényesülnek, és emiatt különböző módon reagálnak adott körülményekre. A kísérlet során a növekedésük alatt mind a vad, mind a domesztikált törzsek ugyanolyan növekedési hatásoknak voltak kitéve, és így képesek vagyunk általános trendeket megfigyelni a két csoport között.

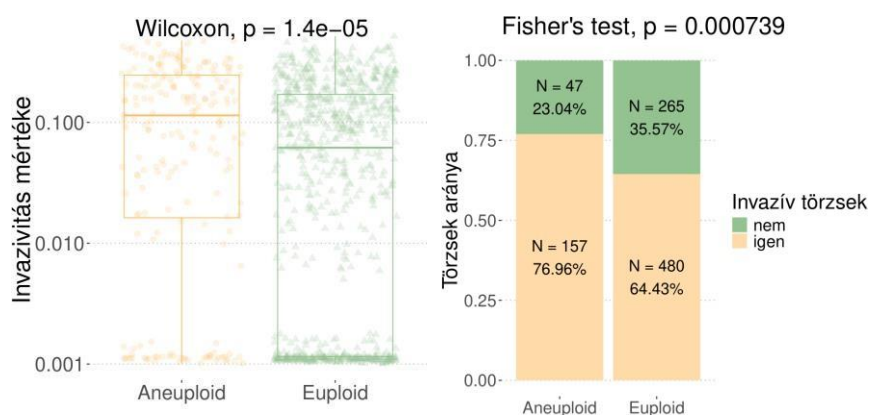
A két csoport közti különbségek meghatározására nem parametrikus Wilcoxon próbát végeztünk el ($p=0,017$), és azt találtuk, hogy a vad élesztők hajlamosabbak az invazivitásra, mint a domesztikált élesztők (9. ábra). Ez alapján arra lehet következtetni, hogy a természetből összegyűjtött élesztők jobban képesek alkalmazkodni a tápanyaghiányhoz, mint a domesztikált élesztők, amelyek rendszerint nem szenvednek tápanyag hiányban az egyes gyártási folyamatok során. Ezért egyes, domesztikált élesztők valószínűleg elvesztették az invazivitáshoz való képességüket, mert nem kellett a természet zordabb körülményeivel megküzdeni. Ezzel szemben azt feltételezzük, hogy a vad izolátumok jobban képesek alkalmazkodni a környezeti változásokhoz, mivel csak azok a törzsek maradhatnak fent sokáig a vadonban, amelyek alkalmazkodó képessége igen magas.



9. ábra. A domesztikált és vad élesztők összehasonlítása. Az x tengelyen a domesztikált és vad élesztőket lehet látni, az y tengelyen pedig az invazivitás mértékét. A bal oldali ábra és a Wilcoxon teszt alapján egyértelműen megállapítható, hogy a vad élesztők magasabb invazivitással rendelkeznek. Emellett az invazív törzsek szignifikáns feldúsulását is tapasztaltunk a vad élesztők esetén (Fisher teszt, $p < 0.01$).

4.2.4. Az invazivitás összehasonlítása az aneuploidok és az euploidok között

Egy fontos kérdés, hogy az élesztőkben a kromoszómák szegregációs hibái miatt létrejött aneuploidia események mennyire befolyásolják az invazív növekedést, amihez a törzseket két csoportba osztottuk: aneuploidok és euploidok (azaz, amelyekben nincs ilyen jellegű hiba). Az elemzéseink során a két csoport között az invazivitás mértékének összehasonlítására először Wilcoxon próbát végeztünk, amellyel alapján elmondható, hogy az invazivitás mértéke nagyobb az aneuploidok között ($p = 1.4 \times 10^{-5}$, 10. ábra).

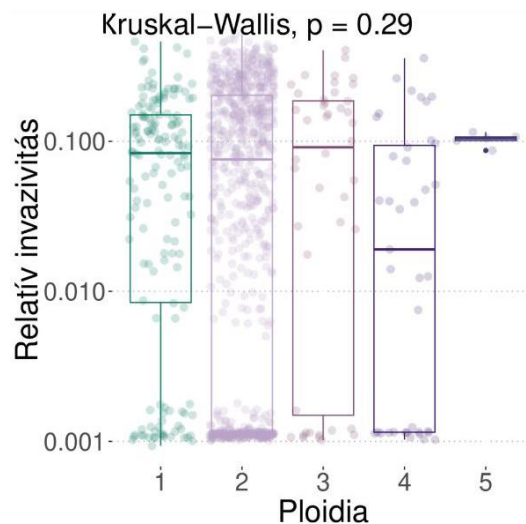


10. ábra. Az euploidok és az aneuploidok összehasonlítása Wilcoxon- és Fisher-tesztel. Az ábra első felén a Wilcoxon teszt eredményét lehet látni, valamint az euploidok és az aneuploidok közötti invazivitásbeli különbségeket box plot-on ábrázolva. Az ábra második felén pedig a Fisher-teszt eredményét lehet látni, valamint az invazív törzsek százalékos eloszlását a két csoport között.

Annak vizsgálatára, hogy van-e összefüggés aközött, hogy egy törzs tartalmaz-e aneuploidiát vagy sem, illetve hogy invazív vagy nem invazív, Fisher-tesztet végeztünk el, aminek eredményeként az aneuploid törzsek esetén az invazív törzsek szignifikáns feldúsulását tapasztaltuk ($p=0,000739$, 10. ábra). Az aneuploid törzsek 77%-a invazív volt, míg ez az érték az euploidok esetén csupán 64,4% volt. Ugyan kevesebb aneuploid törzs ($N = 204$) van, mint euploid ($N = 745$), az aneuploidok esetén arányaiban 19,5%-kal több invazív törzs van, mint az euploidok esetén.

4.2.5. Az invazív növekedés és a ploidia kapcsolata

Az 1011 és az SGRP SET 2 kollekcióban a haploid és diploid törzseken kívül kisebb számban megtalálhatóak triploid, tetraploid és pentaploid törzsek is, ami nagy segítséget nyújt a különböző ploidiajú törzsek összehasonlításához. Annak vizsgálatára, hogy az egyes törzsek ploidiaja képes-e befolyásolni az invazív növekedést, a különböző ploidiajú törzs-csoportokat Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze, amely során nem találatunk szignifikáns heterogenitást ($p = 0,29$, 11. ábra), amely arra utal, hogy a ploidia szintje nem befolyásolja az invazivitás.

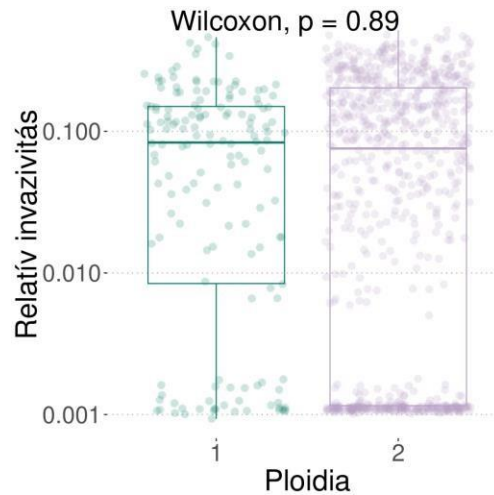


11. ábra. A relatív invazivitás és a ploidia összehasonlítása. Az x tengelyen a ploidia látható, az y tengelyen pedig a relatív invazivitás. Az ábra alapján megállapítható, hogy a ploidia nem befolyásolja az invazív növekedést.

4.2.5.1. Diploidok és haploidok invazív növekedésének összehasonlítása

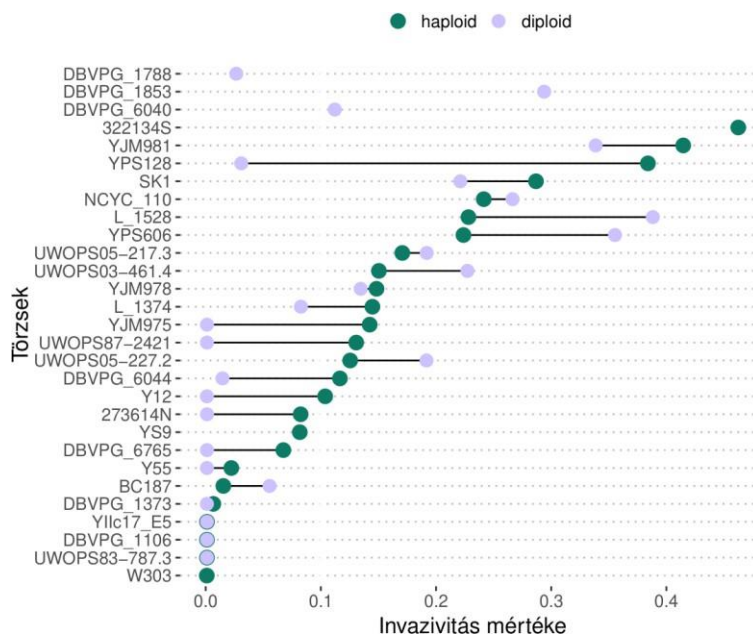
Hagyományosan az invazív növekedést haploid törzsekben vizsgálják (Kuchin és mtsai, 2002), míg ezen tulajdonság diverzitásának feltárása diploidokban eddig még csak kisebb skálán történt meg (lásd Hope és mtsai, 2014). Ennek feloldására a mi általunk elvégzett szisztematikus kísérletek

megoldást nyújtanak, mivel lehetőséget adnak a diploidok és haploidok összehasonlítására. Az 1011 kollekció esetén megállapítottuk azt, hogy a diploidok is képesek invazív növekedésre, azonban az itt található haploid és diploid törzsek egymástól független genotípusok, így azok direkt összehasonlítása nem megoldható. Ennek ellenére összehasonlító analízist végeztünk az 1011 kollekción (12. ábra). Wilcoxon féle előjeles rangpróba használatával meg tudtuk állapítani, hogy nincs szignifikáns különbség a diploidok és haploidok invazivitását vizsgálva (12. ábra).



12. ábra. A relatív invazivitás mértéke a haploid és diploid törzsek között. Az x tengelyen a haploidokat és a diploidokat lehet látni, az y tengelyen pedig a relatív invazivitás mértékét.

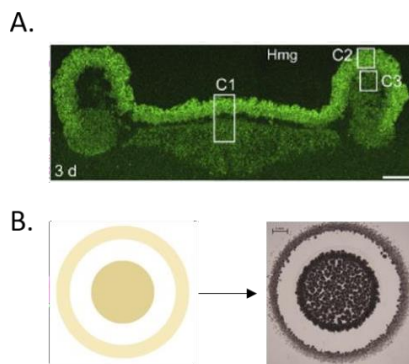
Emellett azonban az SGRP SET 2 kollekció 25 olyan törzset tartalmaz, amelyek megtalálhatóak haploid és diploid állapotban is, azaz lehetőség van ezen izogenikus törzsek közvetlen összehasonlítására és ezáltal meg tudunk állapítani általános trendeket a diploidok és haploidok invazivitásáról. A páros analízis során azt vettük észre, hogy az egyes törzseknél eltérő lehet, hogy a haploid vagy a diploid variáció az invazívabb. Például mint ahogy a 13. ábra is mutatja, az YPS128 törzs esetében a haploid verzió sokkal nagyobb invazivitást mutatott, mint a diploid verziója. Ezzel szemben az L_1528 törzs esetén a diploid törzs mutatott nagyobb invazivitást a haploiddal szemben. Azokban az esetekben, ahol a diploidok és a haploidok invazivitásának mértéke egyező volt, egyik variáció esetében sem figyeltünk meg invazivitást. Ezek alapján meg lehet állapítani, hogy a ploidia és az invazitás mértéke között nincsen általánosan megfigyelhető trend, az inkább genotípus-függést mutat, mivel esetenként eltérő, hogy éppen melyik változat mutat nagyobb invazivitást.



13. ábra. Az SGRP SET 2 kollekció haploid és diploid törzseinek összehasonlítása. Az x tengelyen az invazivitás mértéke látható, az y tengelyen pedig a kollekcióba tartozó törzsek, vízszintes vonallal összekötve az izogenikus haploid és diploid törzsek. A W303 törzs esetében nincsen diploid, amit meg lehet figyelni, a DBVPG_1788, DBVPG_181853 és DBVPG_6040 törzseknél pedig nincsen haploid.

4.3. Az invazív növekedés során keletkező penetrációs mintázatok

A kísérletek elvégzése során megfigyeltük, hogy az egyes invazív törzsek más és más alakzatban nőnek bele az agarba. Ennek vizsgálata alkalmat adhat arra, hogy az egyes lenyomati formákból következtessünk a teljes kolónia (beleértve az agar felszín feletti részt is) morfológiájára, illetve a komplexebb esetekben a telep fejlődésére. Feltételeztük, hogy a benőtt rész mintázata alapján meg lehet állapítani, hogy milyen módon, milyen sorrendben alakultak ki az egyes kolónia részek. Az úgynevezett biofilm kolónia fejlődését Váchová és mtsai. részletesen jellemezték (14. ábra). Az egy napos kolónia alsó sejtjei rövid pseudohifákat képeznek, amelyek penetrálnak a táptalajba. Ezután kialakul a belső üreg, majd a kolónia elsősorban horizontális irányba kezd el nőni, miközben a külső karima megemelkedik. Később a középső kolóniarész tovább terjed horizontális irányba, ezzel tovább tolva a külső peremet, kialakítva egy csészéhez hasonló formát. Ezalatt a perem alapján lévő sejtek a táptalajba penetrálnak (másodlagos penetráció), amely rögzíti a peremet az agarhoz (14. ábra). Feltételezésünk szerint hasonló események állhatnak egyes általunk megfigyelt penetrációs struktúrák megjelenésének hátterében. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy ennek a penetrációs mintázatnak lehet-e köze esetleg valamely, korábban is számításba vett tulajdonsághoz.



14. ábra. A belső sejtmentes gyűrű feltételezett kialakulása. Az “A” részben Váchová és mtsai 2011-es cikkéből láthatunk egy részletet, amely egy telep keresztmetszetét mutatja be. A “B” részben pedig a belső sejtmentes gyűrű sematikus rajzát, és egy példát lehet látni. Feltételezzük, hogy a biofilm kolónia növekedési módjától alakul ki a feltisztult rész a telep lenyomatában.

Az invazivitási kísérletek során készült képek körülbelül egyharmadát dolgoztuk fel, amely során az alábbi tulajdonságokat értékeltük: középső kolóniarész megléte illetve belső sejtmentes gyűrű jelenléte (hiány: 0, jelenlét: 1), valamint a megjelenő szigetek, szektorok, gyűrűk száma, és a külső karima vastagsága (egyőtől ötig terjedő skála, 14. ábra).

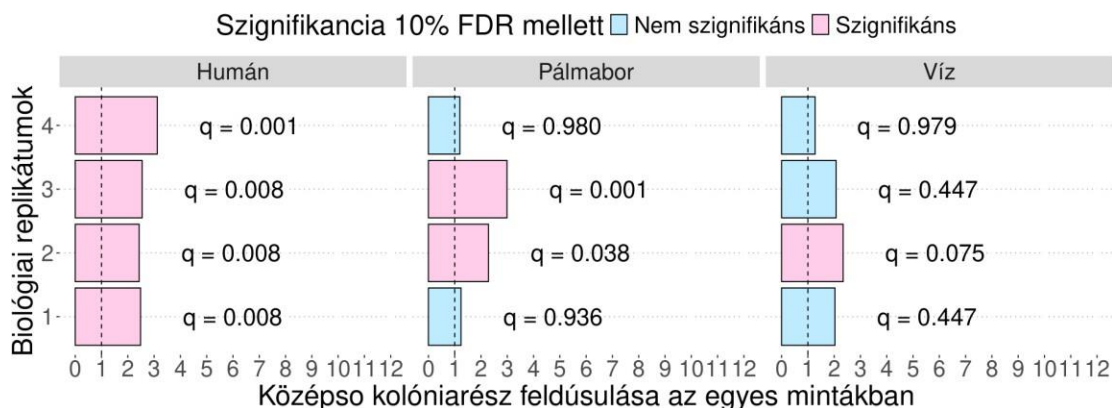
4.3.1. A domesztikáltság hatása a penetrációs mintázatokra

Az adatok analízise során néhány tulajdonság megjelenése és a belső vagy külső környezeti tényezők között kapcsolatot lehet észrevenni. Ilyen kapcsolatra példa a domesztikált és vad törzsek között figyelhető meg: a vad törzseknél gyakrabban található belső sejtmentes gyűrű, valamint középső kolóniarész, mint a domesztikált törzseknél (Wilcoxon-próba, p -érték=0,02). Az ezekkel rendelkező törzsek bonyolultabb struktúrájú lenyomatokat mutatnak, aminek egyik lehetséges oka, hogy könnyebben alkalmazkodnak a különböző környezeti változókhoz. A középső kolóniarész egy nagyon gyakran megfigyelhető morfológiai jelleg a vizsgált törzsek között, és valószínűleg nem véletlen, hogy ehhez mérten azokban a törzsekben gyakoribb, ahol a környezeti viszonyokhoz való alkalmazkodás jobb. A vad élesztőknél emellett a gyűrűk száma is sokkal magasabb, ami utalhat a nagyobb mértékű differenciálódásra és kooperatív sejtkapcsolatokra, ahol minden rétegnek megvan a saját feladata (Wilcoxon-próba, p -érték=0,023).

4.3.2. Az ökológiai eredet hatása a penetrációs mintázatokra

A következőkben megvizsgáltuk az ökológiai eredet hatását a penetrációs mintázatra. A csoportok között szignifikáns különbséget találtunk (Kruskal-Wallis, p -érték=0,023), például a gyűrűk száma megemelkedett a Víz ökológiai környezetben belül, így feltételezhető, hogy ez a

csoport komplexebb kolónia morfológiával rendelkezik, mint egyes, egyszerűbb morfológiával rendelkező csoportok. A belső sejtmentes gyűrű kialakításával kapcsolatban is jelentős eltéréseket láttunk az egyes csoportok között. A Pékség, Sör, Tejtermék, Erjedt, Humán, Ipari, Labor törzs és Víz kategóriák esetén nem találtunk belső sejtmentes gyűrűvel rendelkező törzseket, a Talaj (Fisher-teszt, $p=0,01$), Gyümölcs (Fisher-teszt, $p=0,02$) és Fa (Fisher-teszt, $p=0,025$) kategóriákban viszont gyakori volt ezek jelenléte. Ezek az adatok egybevágóak azzal a megfigyelésünkkel, hogy a domesztikált törzsek között ritkább a belső sejtmentes gyűrű, mint a vad törzsek között. Ennek a sejtmentes gyűrűnek a megléte biofilm kolónia morfológiára utal, amelyet több tanulmányban vad izolátumokkal hoztak összefüggésbe (Váchová és mtsai, 2011). Az ökológiai eredet a középső kolóniarész megjelenését is befolyásolja (15. ábra). A Humán csoportban mindegyik biológiai replikátum esetén látunk feldúsulást, viszont a Pálmabor és a Víz csoportokban csak a replikátumok egy részénél. A nem labor környezetből származó élesztő izolátumok replikátumai közötti gyakori variabilitás arra utal, hogy bizonyos törzsek esetén sztochasztikus folyamatok játszanak szerepet a fenotípus létrehozásában.



15. ábra. Középső kolóniarész feldúsulása az egyes mintákban. Azok a csoportok, amelyekben a középső kolóniarész jelenléte vagy hiánya a legszignifikánsabb. Az ábrán az y tengelyen lehet látni minden csoportban a 4 replikátumot. Az x tengelyen a középső kolóniarész feldúsulási aránya látható. Az oszlopok mellett lehet látni a p-értéket, valamint pontosítás érdekében a q-értéket is ($q < 0,1$).

4.3.3. Penetrációs mintázatok vizsgálata a filogenetikai hovatartozás kapcsán

A penetrációs mintázatokkal összevetettük a filogenetikai eredetet is. Az elemzést megnehezítette az, hogy a 10. French Guiana Human és 13. African Palm Wine kládok közel száz százalékosan átfednek a Humán és Pálmabor csoportokkal, így ezekben az esetekben nem feltétlenül lehet meghatározni, hogy az ökológiai környezetnek vagy a filogenetikai eredetnek van nagyobb hatása. Ezekről eltekintve a középső kolóniarész a 10. French Guiana Human (Fisher-

teszt, $p=0,03$) és a 13. African Palm Wine (Fisher-teszt, $p=0,01$) kládokban kimagaslóan magas számban fordul elő, az 1. Wine/European (Fisher-teszt, $p=0,4$) és 26. Asian fermentation (Fisher-teszt, $p=0,2$) esetén pedig kifejezetten ritkán fordul elő. A kládok befolyásolhatják a gyűrűk számát is, ugyanis szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk az egyes csoportok között (p -érték= $0,00057$). A 23. North American Oak kládban fordulnak elő a leggyakrabban olyan törzsek, amelyek többszörös gyűrűvel rendelkeznek (gyűrűk medián száma = 3). A filogenetikai eredet ezen felül kapcsolatot mutat a belső sejtmentes gyűrű megjelenésével is (Kruskal-Wallis-teszt; p -érték= $0,00049$). Egyes kládokban (pl. 5. French dairy, 6. African beer, 10. French Guiana human, 11. Ale beer) soha nem látható, más kládokban pedig kifejezetten gyakori (pl. Wine/European (alklád 2) [Fisher-teszt, $p=0,005$], 23. North American Oak [Fisher-teszt, $p=1,06 \times 10^4$], 26. Asian fermentation [Fisher-teszt, $p=0,01$]).

4.3.4. A ploidia hatása a penetrációs mintázatokra

Korábbi megfigyelések kimutatták már, hogy a ploidianak hatása lehet a telep morfológiájára (Granek & Magwene, 2010). Következő lépésként ezért összehasonlítottuk a különböző ploiditású törzsek penetrációs mintáit. A ploidia főként a szektorok megjelenésre volt hatással (Kruskal-Wallis, p -érték= $0,0017$): a ploidia növekedésével a szektorok mennyisége jelentősen csökken. A legnagyobb számban a haploidoknál fordultak elő, a legkisebb számban pedig tetraploidoknál lehetett őket megfigyelni (ebben a mérésben nem szerepeltek a pentaploidok). Ezt okozhatja az, hogy a haploidnál magasabb ploidiaszámú, diploid sejtek általában stabilabb genetikai állománnyal rendelkeznek, ami megakadályozhatja a morfológiai variabilitás fokozódását (Heasley & Argueso, 2022). A haploid élesztőkben minden egyes mutáció fenotípusosan kifejeződik, így ott gyakrabban várható variabilitás a morfológiában, így a szektorok kialakulásában is. Ezzel szemben az 1-nél nagyobb ploidia számú sejtekben a heterozigóta formában megjelenő recesszív mutációk nem kerül kifejezésre a vad típusú allél mellett, amelynek eredményeként csökkent morfológiai variabilitás várható, akár például a szektorok számában.

5. Diszkusszió

A multicelluláris életformák kialakulása és megértése az evolúcióbiológia egyik fontos kérdése. Az invazív növekedés valószínűsíthetően nagyon fontos tulajdonsága az élesztőknek, mivel megnövelheti a túlélésre való esélyeiket. A kísérleteink során kapott eredményekből egyértelműen megállapítható, hogy a domesztikáltság, az aneuploidia és a klád-környezet kapcsolata hatással vannak az élesztő törzsek invazív növekedésére, még úgy is, hogy a klád és környezet vizsgálatakor nem mindig tudtunk egyértelmű döntést hozni az esetleg invazivitást okozó tényezőről. A domesztikáltságot tekintve az eredményeink alapján kimondhatjuk, hogy a vad élesztők hajlamosabbak az invazivitásra, mint a domesztikált élesztők. Az aneuploiditás kapcsán pedig azt találtuk, hogy az aneuploid törzsek körülbelül 20%-kal invazívabbak, mint az euploid élesztők. A klád és környezet vizsgálatakor pedig ki tudtunk emelni egyes csoportokat, amelyek a többinél jelentősen nagyobb invazivitást mutattak.

A fonalas növekedéssel foglalkozó kutatások a mai napig nem értenek egyet bizonyos kérdésekben a növekedési formákkal kapcsolatban. Eredményeink azt mutatják, hogy nemcsak a haploid, hanem a diploid élesztősejtek is képesek invazív növekedésre. Ez ellentmond annak a korábbi nézetnek, miszerint a diploidok inkább pszeudohifák kialakítására képesek (Roberts & Fink, 1994). Ezt a megfigyelést alátámasztja Hope és Dunham (2014) munkája is, akik szintén kimutatták a diploid élesztők invazív növekedési képességét kutatásaik során. A vizsgálatok során azt is megfigyeltük, hogy az aneuploidok esetében több törzs mutat invazivitást, és az invazitás mértéke is nagyobb, mint az euploidok esetében. Kutatásunk során azt is megfigyeltük, hogy a vad izolátumok valószínűsíthetően jobban képesek alkalmazkodni a környezeti változásokhoz, mint a domesztikált törzsek, mivel csak azok a törzsek maradhatnak fent sokáig a vadonban, amelyek alkalmazkodó képessége igen magas. Ez a feltételezés azt vonja maga után, hogy a vad élesztők stressz tűrése is magasabb, tehát nagyobb fitneszt mutatnak stresszorok mellett. Ezt megerősíti Matteo De Chiara és mtsai. munkája is, amiben szintén az 1011 kollekción végeztek átfogó kutatást a különböző stresszorokkal szemben (De Chiara és mtsai, 2022).

A tápanyagok hiánya adott stresszválaszokat aktivál, amelynek eredményeként az élesztőgombák invazív növekedése is indukálódhat. Laboratóriumi kísérleteink során ugyan gazdag táptalajt használtunk, de a törzsek 5 napon keresztül nőttek ugyanazon a táptalajon, amely során az elérhető tápanyagok kiürültek, ezáltal stresszválaszt kiváltva. Az eredményeket természetesen a laboratóriumi körülmények korlátai befolyásolhatták, például a mesterséges

környezet nem tükrözi teljesen az élesztők természetes élőhelyét, ahol esetlegesen más növekedési mintázatokat mutathatnak, mivel más környezeti behatásokkal érintkezhetnek (például változó hőmérséklet, UV sugárzás, más biotikus tényezők). Előfordulhat, hogy egyes törzsek laborkörnyezetben elveszítik invazivitásukat, akárcsak a Kuthan és munkatársai által kutatott telepmorfológiák „fluffy” fenotípusa (Kuthan és mtsai, 2003).

A kutatásunk során leírt adatok hozzájárulhatnak az élesztők morfológiai jellemzőinek mélyebb megértéséhez, és új kutatási irányokat nyithat a haploid és diploid sejtek morfológiájának feltárásában. Az invazív növekedés mérésére használt módszereket már sokan mások is alkalmazták, de az ebben a kutatásban használt törzskollekció az egyik legnagyobb, emiatt kutatásunkkal általános törvényszerűségeket tudtunk feltárni. Ez az átfogó kollekció lehetővé teszi, hogy különböző genetikai háttérrel rendelkező törzseket tudjunk megvizsgálni, ami segít az egyedi jellemzők feltárásában, valamint abban, hogy szélesebb körű következtetéseket vonhassunk le az invazivitással kapcsolatban. Ezen kívül egy ekkora kollekció használata növeli a kutatás statisztikai erejét és relevanciáját is.

A jövőben tervezzük a használt törzskollekciók pszeudohifa képzésének vizsgálatát, valamint az invazitás és a kompenzáló evolúció közötti kapcsolat elemzését. Utóbbi célja, hogy feltárja a káros deléciók hatására megjelenő kompenzáló molekuláris mechanizmusokat. Céljaink között szerepel annak felderítése, hogy a káros és kompenzációs mutációk együtt előfordulnak-e természetes törzsekben, illetve, hogy ezek hozzájárulnak-e a természetes törzsek esetén megfigyelt morfológiai diverzitáshoz. Eredményeink remélhetőleg hozzájárulnak a többsejtű fenotípusok, például az invazív növekedés és a pszeudohifa képzés evolúciós hátterének jobb megértéséhez.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Papp Balázsnak, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Számítógépes Rendszerbiológiai Kutatóegység vezetőjének, Dr. Sarkadi Zsuzsa, tudományos munkatársnak, és Dr. Farkas Zoltánnak, tudományos munkatársnak, akik szakértelmükkel, hasznos tanácsaikkal és elengedhetetlen magyarázataikkal nagy segítséget nyújtottak ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

7. Irodalom jegyzék

- Carter, D. (2008). *Saccharomyces Genome Resequencing Project: User Manual*.
- Ceccato-Antonini, S. R., & Sudbery, P. E. (2004). Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 173–181.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000200001>
- Chow, J., Dionne, H. M., Prabhakar, A., Mehrotra, A., Somboonthum, J., Gonzalez, B., Edgerton, M., & Cullen, P. J. (2019). Aggregate Filamentous Growth Responses in Yeast. *mSphere*, 4(2), 10.1128/msphere.00702-18. <https://doi.org/10.1128/msphere.00702-18>
- Cullen, P., & Sprague, G. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25).
<https://doi.org/10.1073/pnas.240345197>
- De Chiara, M., Barré, B. P., Persson, K., Irizar, A., Vischioni, C., Khaiwal, S., Stenberg, S., Amadi, O. C., Žun, G., Doberšek, K., Taccioli, C., Schacherer, J., Petrovič, U., Warringer, J., & Liti, G. (2022). Domestication reprogrammed the budding yeast life cycle. *Nature Ecology & Evolution*, 6(4), 448–460. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01671-9>
- de Llanos, R., Querol, A., Pemán, J., Gobernado, M., & Fernández-Espinar, M. T. (2006). Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.023>
- Farkas, Z., Kovács, K., Sarkadi, Z., Kalapis, D., Fekete, G., Birtyik, F., Ayaydin, F., Molnár, C., Horváth, P., Pál, C., & Papp, B. (2022). Gene loss and compensatory evolution promotes the emergence of morphological novelties in budding yeast. *Nature Ecology & Evolution*, 6(6), 763–773. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01730-1>

- Gancedo, J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00573.x>
- Goossens, K., & Willaert, R. (2010). Flocculation protein structure and cell–cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1571–1585. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0352-3>
- Granek, J. A., & Magwene, P. M. (2010). Environmental and Genetic Determinants of Colony Morphology in Yeast. *PLoS Genetics*, 6(1), e1000823. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000823>
- Guillemot, G., Lorthois, S., Schmitz, P., & Mercier-Bonin, M. (2007). Evaluating the Adhesion Force Between *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast Cells and Polystyrene From Shear-Flow Induced Detachment Experiments. *Chemical Engineering Research and Design*, 85(6), 800–807. <https://doi.org/10.1205/cherd06082>
- Heasley, L. R., & Argueso, J. L. (2022). Bursts of Genomic Instability Potentiate Phenotypic and Genomic Diversification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.912851>
- Hope, E. A., & Dunham, M. J. (2014). Ploidy-Regulated Variation in Biofilm-Related Phenotypes in Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 4(9), 1773–1786. <https://doi.org/10.1534/g3.114.013250>
- Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., & Iimura, Y. (2006). FLO11 Is the Primary Factor in Flor Formation Caused by Cell Surface Hydrophobicity in Wild-Type Flor Yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(3), 660–666. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.660>

- Jin, R., Dobry, C. J., McCown, P. J., & Kumar, A. (2008). Large-Scale Analysis of Yeast Filamentous Growth by Systematic Gene Disruption and Overexpression. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1), 284–296. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0519>
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLOS ONE*, 6(2), e16015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>
- Kuchin, S., Vyas, V. K., & Carlson, M. (2002). Snf1 Protein Kinase and the Repressors Nrg1 and Nrg2 Regulate FLO11, Haploid Invasive Growth, and Diploid Pseudohyphal Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12), 3994–4000. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.12.3994-4000.2002>
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., & Palková, Z. (2003). Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular Microbiology*, 47(3), 745–754. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03332.x>
- Kuzdzal-Fick, J. J., Chen, L., & Balázs, G. (2019). Disadvantages and benefits of evolved unicellularity versus multicellularity in budding yeast. *Ecology and Evolution*, 9(15), 8509–8523. <https://doi.org/10.1002/ece3.5322>
- Legras, J.-L., Moreno-Garcia, J., Zara, S., Zara, G., Garcia-Martinez, T., Mauricio, J. C., Mannazzu, I., Coi, A. L., Bou Zeidan, M., Dequin, S., Moreno, J., & Budroni, M. (2016). Flor Yeast: New Perspectives Beyond Wine Aging. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00503>
- Lim, S. Y., R, R., H.F., S., & P. P. Chong. (2012). *Candida and invasive candidiasis: Back to basics* | *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-011-1273-3>

- Liu, H., Styles, C. A., & Fink, G. R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C Has a Mutation in FL08, a Gene Required for Filamentous Growth. *Genetics*, 144(3), 967–978.
<https://doi.org/10.1093/genetics/144.3.967>
- Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J.-X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freil, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J.-M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., ... Schacherer, J. (2018). Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556(7701), 339–344.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>
- R: The R Project for Statistical Computing*. (2001). <https://www.r-project.org/>
- Reynolds, T. B., Jansen, A., Peng, X., & Fink, G. R. (2008). Mat Formation in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Nutrient and pH Gradients. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 122–130.
<https://doi.org/10.1128/ec.00310-06>
- Roberts, R. L., & Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: Mating and invasive growth. *Genes & Development*, 8(24), 2974–2985.
<https://doi.org/10.1101/gad.8.24.2974>
- Rua, D., Tobe, B. T., & Kron, S. J. (2001). Cell cycle control of yeast filamentous growth. *Current Opinion in Microbiology*, 4(6), 720–727. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(01\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(01)00274-0)
- Shively, C. A., Eckwahl, M. J., Dobry, C. J., Mellacheruvu, D., Nesvizhskii, A., & Kumar, A. (2013). Genetic Networks Inducing Invasive Growth in *Saccharomyces cerevisiae* Identified Through Systematic Genome-Wide Overexpression. *Genetics*, 193(4), 1297–1310. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.147876>

- Váchová, L., Šťovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L., & Palková, Z. (2011). Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *Journal of Cell Biology*, 194(5), 679–687.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201103129>
- Warena, A. J., Kauffman, S., Sherill, P. T., Becker, M. J., & Konopka, J. P. (2003). *Candida albicans Septin Mutants Are Defective for Invasive Growth and Virulence* | *Infection and Immunity*. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.71.7.4045-4051.2003>
- Zupan, J., & Raspor, P. (2010). Invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae* depends on environmental triggers: A quantitative model. *Yeast*, 27(4), 217–228.
<https://doi.org/10.1002/yea.1746>

8. Függelék

Kládok nevei	Rövidítésük
1. Wine/European	01.W
1. Wine/European (subclade 1)	01.W
1. Wine/European (subclade 2)	01.W
1. Wine/European (subclade 3)	01.W
1. Wine/European (subclade 4)	01.W
10. French Guiana human	10.F
11. Ale beer	11.A
12. West African cocoa	12.W
13. African palm wine	13.A
14. CHNIII	14.C
15. CHNII	15.C
16. CHNI	16.C
17. Taiwanese	17.T
18. Far East Asia	18.F
19. Malaysian	19.M
2. Alpechin	02.A
20. CHN V	20.C
21. Ecuadorean	21.E
22. Far East Russian	22.R
23. North American oak	23.N
24. Asian islands	24.A
25. Sake	25.S
26. Asian fermentation	26.A
3. Brazilian bioethanol	03.B
4. Mediterranean oak	04.M
5. French dairy	05.F
6. African beer	06.A
7. Mosaic beer	07.M
8. Mixed origin	08.M
9. Mexican agave	09.M
laboratory	laboratory
M1. Mosaic region 1	M1.M
M2. Mosaic region 2	M2.M
M3. Mosaic region 3	M3.M

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Kittlinger Villő nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott „A többsejtű formák evolúciójának vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae*-ben” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

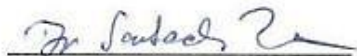
Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
A kísérleti törzsek összeállítása	4
A kísérletek kivitelezése	5
Az kapott eredmények digitalizálása	5
Az adatok statisztikai feldolgozása	4
A penetrációs mintázatok átfogó kiértékelése	4
Az ábraanyag elkészítése	5

Kelt: 6724. Szeged, 2024. 11. 05.



Pályamunkát benyújtó hallgató, Kittlinger Villő
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető, Dr. Sarkadi Zsuzsa (HUN-REN Szegedi
Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet)
aláírása