

37. OTDK Biológia Szekció

**Termőtestképzésben potenciálisan szerepet játszó,
RNS-kötő fehérjét kódoló gének funkcionális
jellemzése *Coprinopsis cinerea* modellszervezetben**

Szathmári Benedek

Molekuláris biológia MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem,
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezetők: dr. Nagy László és dr. Csernetics Árpád
Belső konzulens: dr. Kocsubé Sándor

2024.

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	2
2.1. Komplexitás – különös tekintettel a gombák komplex soksejtűségére és annak evolúciójára.....	2
2.2. A termőtestképző gombák gyakorlati jelentősége	7
2.3. A <i>Coprinopsis cinerea</i> életmenete	8
2.4. A <i>Cryptococcus neoformans</i> ivaros életmenetének molekuláris háttere	11
3. Hipotézis és célkitűzések	13
4. Anyagok és módszerek.....	15
5. Eredmények és diszkusszió	23
5.1. A <i>Cc.pum1</i> és a <i>Cc.csa2</i> gének delécioja és a mutánsok jellemzése	21
5.2. A <i>Cc.pum1</i> és a <i>Cc.csa2</i> gének túlműködtetése.....	22
5.3. A $\Delta Cc.pum1$ mutáns transzkriptomanalízise	24
6. Köszönetnyilvánítás	35
7. Irodalomjegyzék.....	35
8. Tételes szerzői hozzájárulás	39

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Komplexitás – különös tekintettel a gombák komplex soksejtűségére és annak evolúciójára

A sejtés élőlényeket komplexitásuk alapján legkézenfekvőbb módon egysejtű és soksejtű szervezetekre oszthatjuk. A gombák körében találunk elsődlegesen egysejtű (korán divergálódó kládok, pl. Rozellomycota), másodlagosan egysejtű (élesztőgombák) (Nagy és mtsai., 2014) és soksejtű képviselőket is. A soksejtűség kialakulásának hagyományosan két módját különböztetjük meg: az aggregációs és a klonális utat (Szathmáry, 2024). Előbbi esetben, mely újítás valószínűleg a szárazföldön jelent meg, szoliter sejtek szerveződnek össze, a feltételezhetően vízben megjelent klonális úton pedig utódsejtek együttmaradásával jön létre a magasabb komplexitás (Szathmáry, 2015). A *Dictyostelium discoideum* amőba aggregatív úton kialakuló „termőtestéről” ismert, hogy a különböző genommal rendelkező sejtek versengenek a spórák kialakításáért (Castillo és mtsai., 2011). Ezzel ellentétben a klonalitás nem hordoz magában genetikai konfliktust, melynek köszönhetően az ilyen módon létrejött soksejtűség elterjedtebb és nagyobb diverzitást mutat az aggregációs úthoz képest. A soksejtűség legalább ötven független megjelenése feltételezhető (Bingham és Ratcliff, 2024). A gombák hifás szerveződése nehezen helyezhető el ebben a dichotómiában: a sejtmagok szintjén klonálisnak tekinthető (Nagy és mtsai., 2020), viszont evolúciós eredetük nagyban eltérhet: egy elmélet szerint a hifák a korai gombák rizoidjaiból jöttek létre, egy másik azt állítja, hogy a policentrikus kitridek (Chytridiomycota) talluszainak összeköttetéseiből (Kiss és mtsai., 2019; Nagy és mtsai., 2020; Virágh és mtsai., 2021). A hifás szerveződés az ozmotróf életmóddal hozható összefüggésbe.

A soksejtűség lehet egyszerű vagy komplex; utóbbi koncepció, a komplex soksejtűség áll kutatásaink és jelen dolgozat középpontjában. Mind az egyszerű, mind a komplex soksejtűség megjelenését a fő evolúciós átmenetek közé sorolja az evolúcióbiológia (Szathmáry, 2015). A komplex soksejtűség hagyományosan úgy közelíthető, hogy nagyméretű élőlények jellemzője, melyek több sejtípussal rendelkeznek. (Szathmáry, 2024). Ennél egzaktabb értelmezést tesz lehetővé Knoll operatív megközelítése (Knoll, 2011), mely a háromdimenziós, kompakt szerveződést tekinti a komplex soksejtűség alapvető ismérvének, azaz hogy az ilyen élőlénynek vannak a környezettel nem érintkező sejtjei; ezen felül fontos komplex soksejtű jellegeknek tartja, hogy a struktúrát fejlődési program hozza létre, különböző sejtípusokkal rendelkezik, a sejtek kommunikálnak egymással, rendelkezik transzportmechanizmusokkal a diffúzió limitációinak leküzdése céljából, illetve jellemző rá a

programozott sejthalál. A komplex soksejtűsége kizárólag az eukarióták doménjén belül találunk példákat. Ennek oka abban keresendő, hogy az eukarióta sejt olyan jellemzőivel, mint a dinamikus citoskeletális és membránrendszerek, valamint a bonyolult génszabályozás, „táptalajként szolgált” a komplex soksejtűség megjelenésének (Knoll, 2011; Szathmáry, 2015). Újabb elméletek szerint a komplex soksejtűség megjelenése nem feltétlenül adaptív; egyes, a komplexifikáció „felé mutató” változások önmagukban kifejezetten hátrányosak lehetnek (Lynch, 2007). Neutrálisan úgy választható ez az evolúciós trajektória, hogy mivel a soksejtűség drasztikusan csökkenti az effektív populációméretet, alacsony populációméret mellett pedig a sodródás dominál a szelekció felett, a komplexitás növekedéséhez (komplexifikációhoz) szükséges, önmagukban nem feltétlenül előnyös változásokat „nem látja” a szelekció (Bingham és Ratcliff, 2024; Lynch, 2007, Szathmáry, 2024).

A komplex soksejtűség az állatok országában egyszer, a barnamoszatok körében szintén egyszer (Laminariales), a növényeknél pedig kétszer jelent meg: a zöld színtestűek leszármazási vonalán komplex soksejtűek az Embryophyta klád képviselői, a vörösmoszatok leszármazási vonalán a Florideophyceae osztály, melyben a komplex soksejtűség valószínűleg a legkorábban jelent meg (Knoll, 2011). A legtöbb áttekintő tanulmány a gombák országában két megjelenésről értekezik (Basidiomycota és Ascomycota), de filogenetikai és ősiszakaraterállapot-rekonstrukciós vizsgálatok alapján tudjuk, hogy valójában 8-11-re tehető a független megjelenések száma; így a gombák leszármazási vonala az egyetlen, ahol a komplex soksejtűség konvergens jelleg (Nagy és mtsai., 2018, 2020; Virágh és mtsai., 2021). Ez azért is rendkívül érdekes, mert a sok független megjelenés nehezen illeszkedik abba, ahogyan a fő evolúciós átmenetekről gondolkodunk, azaz hogy nehezen leküzdhető genetikai akadályok állnak az átmenet útjában, melyek egyszeri vagy legalábbis kisszámú független megjelenést tesznek lehetővé (Szathmáry és Smith, 1995).

A gombák vegetatív micéliuma, egyedi hifákból formálódó szaporítóképletei (pl. konidiofór), illetve a biofilmek egyszerű soksejtű szerveződéseknél tekinthetők, míg az ivaros és ivartalan (komplex) termőtestek, a szkleróciumok, a rizomorfozások az ektomikorrhizás képletek, illetve az üszöggombák (Ustilaginales) által gazdanövényen kialakított daganatjellegű terjesztőképletek komplex soksejtűnek (Nagy és mtsai., 2018; Virágh és mtsai., 2021). A komplex soksejtű gombáknál egyszerre van jelen az egyszerű és komplex soksejtűség. A termőtesteknél nincs éles határ a két komplexitási szint között: az egyszerű termőtestek (zselés és kéregszerű reszupinátus) már mutatják a komplex soksejtűség bizonyos attribútumait (pl. steril hifák is részt vesznek a felépítésükben, azaz többféle sejtípus van

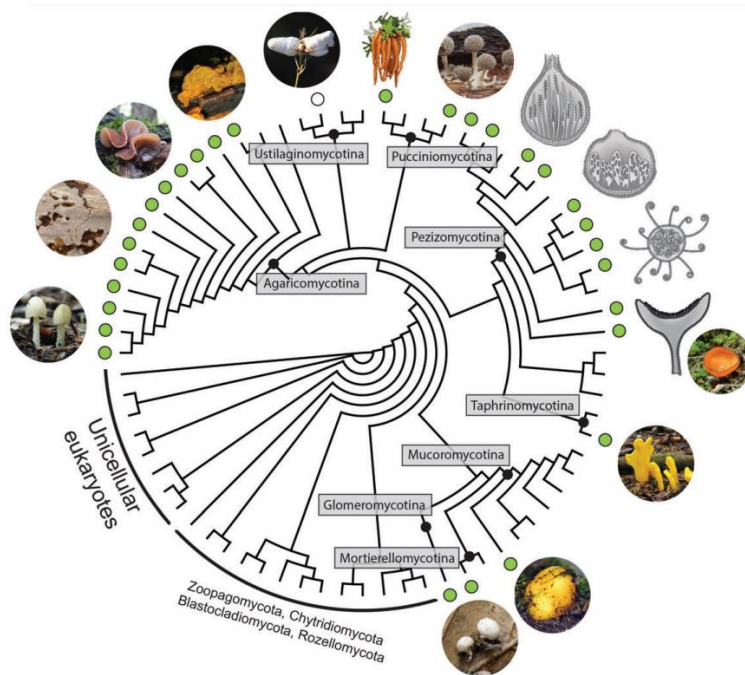
jelen); a komplex termőtestek valószínűleg ilyen szerveződésekből jötte létre (Virágh és mtsai., 2021). (Ritkán a *Cryptococcus neoformans* és hasonló komplexitású fajok csupasz bazídiumai alkotta tömött gypet mint a legegyszerűbb reszupinátus formát arachnoid termőtestnek nevezik (Virágh és mtsai., 2021), mely azonban egyszerű soksejtű.) Az egyszerű termőtestek komplexitás szempontjából kontinuumot alkotnak, a komplex termőtestek viszont besorolhatók néhány szemidiszkrét morfológiába, úgy, mint kalapos-tönkös termőtest (pilotécium), kalapos-szesszilis termőtest, gaszterotécium, korallloid-clavaroid, cyphelloid termőtest, illetve krusztotécium (Hibbett, 2007).

A termőtestek feladata a szaporítóképletek védelme és a spórák terjesztése (Hibbett, 2007). Miért is tekinthetők komplex soksejtűnek a (komplex) termőtestek – a knolli definíció alapján? Háromdimenziós, kompakt szerkezettel rendelkeznek, melyben vannak a külvilággal nem érintkező sejtek; a vegetatív micéliummal szemben determinált a növekedésük. A sejtek kommunikálhatnak egymással feromonok, illékony anyagok és quorum sensing molekulák segítségével az extracelluláris téren keresztül (Kües és mtsai, 2018). A viszonylagos formaállandóság fejlődési programok meglétére utal. Ismeretes, hogy a lemezfejlődésben szerepet játszik az autofágia (tehát van programozott sejthalál) (Kües és Navarro-González, 2015), továbbá a legkomplexebb termőtestek feltételezhetően hidrofobinokkal bélelt légcsatornák segítségével küzdik le a diffúzió limitációit (Lugones 1999) – tehát rendelkeznek szállítóstruktúrákkal. A *Coprinopsis cinerea* termőtestében legalább harminc sejttípus különíthető el csupán morfológia alapján (Kües és Navarro-González, 2015), és bár a termőtesteket hagyományosan álszövetesnek tekintik (a gombaálszöveteket plektenchimáknak is nevezik) (Mikológiai Társaság, 1991; Cléménçon, 2004), az újabb irodalom többségében elhagyja a megkülönböztetést, és egyszerűen a szövet kifejezést használja (Merényi és mtsai, 2022; Nagy és mtsai, 2022). A pilotéciumokban szövetnek tekinthető például a nodulusz, a kalap-, a lemez-, a tönkszövet és a vélum. A komplex termőtestek komplexitása összemérhető az egyszerűbb felépítésű állatokéval (Nagy és mtsai., 2023).

A komplex soksejtűség a gombák országában tehát 8-11-szer jelent meg (1. ábra). A Dikarya kládon kívül, a Mucoromycota törzsben három fajszegény, komplex soksejtű kládot találunk: az egyik a Mortierellomycotina altörzs globuláris termőtesttel rendelkező *Modicella* nemzetsége, a másik a Glomeromycotina altörzs *Glomus* nemzetsége, a harmadik pedig a Mucoromycotina altörzs Endogonales rendje; utóbbi két csoport képviselői a szarvasgombákéhoz hasonló földalatti termőtestet hoznak. Minden más képviselőt a bazídiumos és tömlősgombák között kell keresnünk. Az Ascomycota törzs Taphrinomycotina

leszármazási vonalán élesztőszerű szervezetek közé ékelődve találjuk az enigmatikus *Neolecta* nemzetséget, melynek az élesztőgombákhoz hasonlóan kevés (csupán 5500) fehérjekódoló génje van, mely arra utal, hogy a gombák esetén a komplex soksejtű szerveződés létrehozása nem feltétlenül igényel több gént, mint az egyszerű soksejtű vagy egysejtű szerveződés kialakítása (Nguyen és mtsai., 2017). Az aszkuszosok Pezizomycotina altörzsébe tartozó fajok rendkívül diverz ivaros és ivartalan termőtesteket, valamint szkleróciumokat hoznak. Az aszkómák többsége mikroszkopikus, de találunk makroszkopikus termőtesteket is (pl. *Morchella*, *Helvella*, *Gyromitra* és *Tuber* nemzetségek képviselőinél). A Basidiomycota törzs mindhárom altörzsében megjelent a jelleg. A Pucciniomycotina altörzsben ivaros és ivartalan termőtesteket is találunk (pl. piknídium, acervulusz); az ide tartozó fajok életmenetük során rendszerint többféle termőtestet is hoznak. A bizonytalanság ebben a kládban van a megjelenések számát illetően (Nagy és mtsai., 2018). Az Ustilaginomycotina növénypatogén képviselői (üszöggombák) életciklusuk fonalas szakaszában tumorszerű terjesztőképletet hoznak létre a gazdanövény szöveteiből, mely szintén komplex soksejtűnek tekinthető. Laboratóriumi körülmények között, megfelelő növényi hormonokkal kezelve az *Ustilago maydis* is képes termőtestet hozni, melyben három szövetréteg különíthető el, és a parazita életciklustól eltérően olyan valószínűleg ősi Basidiomycota bélyegeket is mutat, mint a holobazídium és a csatképzés (Cabrera-Ponce és mtsai., 2012; León-Ramírez és mtsai., 2017). A gombák országában az Agaricomycotina klád érte el a legmagasabb komplexitást, találunk termőtesteket, rizomorfokat, szkleróciumokat és ektomikorrhizás képleteket is. Ide tartoznak a legismertebb és legnagyobb gazdasági jelentőséggel bíró termőtestképző gombák.

A komplex termőtestek az egyszerű termőtestekből alakultak ki. Az Agaricomycotina kládra jellemző, különböző szemidiszkrét morfológiák nagy plaszticitást mutatnak, a csoport evolúciója során dinamikusan egymásba alakulnak (Varga és mtsai., 2019). A koralloid forma tranziensnek tekinthető (Sánchez-García és mtsai., 2020); az ún. szekotoid termőtestek a pilotécium és gaszterotécium közötti átmeneti formák, melyeknek a gaszteromycetáció során még nem zárult be teljesen a termőrétege (Virágh és mtsai., 2021). Egyes morfológiáknál száznál is több független megjelenés (más morfológiákból való kialakulás) feltételezhető. Ez a plaszticitás is a gombákra jellemző sajátosság, az állatok és növények alapszabása konzerváltabb. A legelterjedtebb morfológia a pilotécium, az Agaricomycotinába tartozó fajok mintegy 70%-a ilyen termőtestet képez (Virágh és mtsai., 2021). Fossziliák révén ismert, hogy a morfológia legalább százmillió éve lényegében változatlan.



1. ábra. Komplex soksejtű csoportok filogenetikai helyzete és jellemző morfológiáik (Nagy és mtsai., 2018). A komplex soksejtű csoportokat zöld kör jelöli. A képek (balról az óramutató járásával megegyező irányban haladva) az alábbi fajokról készültek: *Bolbitius titubans*, *Gloeocystidiellum* sp., *Auricularia auricula-judae*, *Tremella mesenterica*, *Testicularia cyperi*, *Gymnosporangium clavariiforme*, *Phleogena faginea*, *Podospora anserina*, *Mycosphaerella* sp., *Microspheara* sp., *Peziza* sp., *Neolecta irregularis*, *Endogone flammirocona*, *Modicella reniformis*.

Az, hogy a termőtestekre jellemző a viszonylagos egyszerűség és a plaszticitás, ugyanakkor a konvergencia és a morfológiák konzerváltsága is, arra utal, hogy a természetes szelekció hangsúlyos alakítója ezen fenotípusoknak (Virágh és mtsai., 2021). Kevés ismerettel rendelkezünk a konvergencia mibenléte felől, azaz hogy a természetes szelekció, valamint a külső és belső kényszerek hogyan limitálják a morfofoteret (a potenciális fenotipikus diverzitást), hogyan idézik elő hasonló formák egymástól független és újbóli felbukkanását.

Az összes termőtestképző gomba közös őse nem rendelkezett termőtesttel, viszont ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a komplex soksejtűség független megjelenései genetikai értelemben is teljesen függetlenek egymástól. A homoplázia koncepciója nem teljesen a homológia antitézise, és a két fogalom nem kizárólagos; homológ gének bevethetők homológ és homoplasztikus struktúrák létrehozásához is (Hall, 2007). Az átmenet a mélyhomológia és a látens homológia fogalmán keresztül érzékeltethető leginkább. A mélyhomológia (Shubin és mtsai., 2009) és a látens homológia (Nagy és mtsai., 2014) koncepciói szerint ősi, konzervált szabályozási hálózatok szolgálhatnak a konvergens fenotípusok genetikai háttereként, melyek predisponálják az ilyen, rokon leszármazási vonalakat a konvergens jellegek kialakítására (Nagy és mtsai., 2018). Látens homológiáról akkor beszélünk, ha az ilyen, konzervált fejlődési modulok párhuzamosan kooptálódnak azonos funkció betöltésére (ezzel

magyarázható valószínűleg az élesztőmorfológia többszöri megjelenése (Nagy és mtsai., 2014)), mélyhomológiáról pedig abban az esetben, ha független jellegek kialakításához szükséges szabályozási hálózatok hierarchiájában magasan elhelyezkedő elemek homológok (pl. az emlősök és a lábasfejűek hólyagszemének kialakításában is szerepet játszik a Pax6 transzkripciós faktor) (Shubin és mtsai., 2009). Az, hogy az ivaros termőtestek megjelenéséhez szükségesek olyan erősen konzervált genetikai elemek, mint a párosodási típust meghatározó lokuszok és a kék hullámhossztartomány érzékelésében szerepet játszó WCC (*white collar complex*), már korábban felvetette a genetikai predispozíció lehetőségét (Nagy és mtsai., 2018). A komplex soksejtű gombafajok túlnyomó többségét magába foglaló két, egymástól több mint 650 millió éve elváló klád, az Agaricomycotina és a Pezizomycotina összehasonlításából az derült ki, hogy számos ősi gén konvergensen kooptálódott ugyanazon funkcióra a két kládban, és az ilyen géncsaládok jelentős része expandált a két leszármazási vonalon. Ez és a soksejtűséggel összefüggésbe hozható gének dúsulása a két altörzs legközelebbi közös ősének genomjában arra utal, hogy a genetikai predispozíció igenis szerepet játszott a komplex soksejtűség többszöri megjelenésében (Merényi és mtsai., 2020). Conte és mtsai. szerint a csupán neutrális folyamatok révén megvalósuló paralel kooptáció valószínűtlen, hasonló szelekciós nyomások is kellenek ahhoz, hogy a modulok evolúciója azonos irányba kanalizálódjon (Conte és mtsai., 2012).

2.2. A termőtestképző gombák gyakorlati jelentősége

A termőtestképző gombák egyre markánsabb gazdasági jelentőséggel bírnak; felhasználásuk rendkívül sokrétű. Kb. 200 ehető gombafaj kapható kereskedelmi forgalomban. Ezek egy részét gyűjtik (pl. *Laetiporus sulphureus* – sárga gévagomba; *Tuber* sp. – szarvasgombák), más fajoknak – egyre több fajnak – (pl. *Lentinula edodes* – shiitake) pedig megoldott a nagyüzemi termesztése. A globális gombatermelés túlnyomó részét három faj, az *Agricus bisporus* – kétspórás csiperke, a *L. edodes* és a *Pleurotus ostreatus* – kései laskagomba, teszi ki. Egyes becslések 2020-hoz képest 2027-re az ehető gombák piacának 60%-os növekedését jósolják (Niego és mtsai., 2021). A régen „házasított”, régóta termesztésben lévő gombatörzsek rendkívül hasonlítanak vadon élő fajtársaikhoz, tehát a termesztett növényektől és tenyésztett állatoktól eltérően az ember nem volt képes mesterséges szelekcióval felerősíteni a gombák felhasználás szempontjából előnyös tulajdonságait (Virágh és mtsai., 2021). Ezért is rendkívül fontos a termőtestképzés genetikájának megismerése; az ismeretek bővítése a jövőben genommérnökséggel (vagy akár nemesítéssel) javíthatóvá teheti a tulajdonságokat (pl. magasabb tápérték), hatékonyabbá

teheti a gombatermesztést (pl. spóramentes termőtestek), és újabb, innovatív gombaalapú technológiák megjelenését eredményezheti.

A termőtestképző gombák a hatóanyag-kutatásban is fontos szerephez jutnak. Példaként *Cordyceps* fajokból és az *Omphalotus illudens*ből klinikai kipróbálás alatt álló tumorellenes vegyületeket izoláltak (Yoon és mtsai., 2018).

A termőtestképző gombák hatékony lebontó szervezetekként fontos szerepet töltenek be a biológiai anyagkörforgásban. Hozzávetőleg 6000 szárazföldi növényfajra jellemző a főleg bazídiumos gombákkal létesített ektomikorrhizas kapcsolat. A gombapartner jelenléte ellenállóbbá teszi a növényt és javítja a talajszerkezetet (Hyde és mtsai., 2019). Az Ustilaginomycetes és a Pucciniomycotina kládok egyes képviselői ökológiai károkat (*Cronartium ribicola*) vagy a mezőgazdasági termelésben tetemes termés kiesést (*Ustilago maydis*) okozhatnak (Hyde és mtsai., 2019).

A termőtestképző gombák több olyan tulajdonsággal is rendelkeznek, melyek alapján fontos szerepet játszhatnak a környezetkárosító anyagok lebontásában és a zöld átállásban. Főként a fehér korhasztók (pl. *Phanerochaete chrysosporium*, *P. ostreatus*) extracelluláris enzimeinek (lignin-peroxidázok, lakkázok) széles szubsztrátspecifitása teszi lehetővé peszticidek, policiklusos aromás szénhidrogének és egyéb szennyezőanyagok lebontását (Hyde és mtsai., 2019). Számos faj (pl. *Lactarius piperatus* – fehértejű keserűgomba) a nehézfémekkel szennyezett élőhelyek megtisztítására is bevethető lehet, hiszen felveszik és felhalmozzák ezeket az elemeket (Kalac és Svoboda, 1999). A lignocellulóz-bontó enzimek a bioüzemanyaggyártást is megreformálhatják (Canam és mtsai., 2013). Megfelelő szubsztráton nevelve a gombák óriási biomasszát képesek fejleszteni, a tömör micélium pedig jó hőszigetelő tulajdonsággal bír, mely utat nyit a gombák építőipari hasznosításának. A szubsztrátként szolgáló mezőgazdasági és faipari hulladékból, valamint termőtestképző gombák (pl. *Ganoderma lucidum* – pecsétviaszgomba) vegetatív micéliumából felépülő kompozit blokkok fenntartható építőanyagnak ígérkeznek (Moser és mtsai., 2017). Krusztotéciumokból régóta és a világ számos vidékén készítenek használati tárgyakat (ld. korondi taplászat). Számos kutatás irányul az ipari léptékben előállítható, gombaalapú bőrhelyettesítő anyagok fejlesztésére olyan fajokból, mint a *Fomes fomentarius* – bükkfatapló (Jones és mtsai., 2021).

2.3. A *Coprinopsis cinerea* életmenete

A termőtestképző gombák közül a *Schizophyllum commune* (hasadtlemező gomba) mellett a *C. cinerea* (trágyatintagomba) tekinthető a termőtestképzés modellorganizmusának

(de Mattos-Shipley és mtsai., 2016). Utóbbi kalapos-tönkös termőtestet fejleszt; rövid életciklusa és laboratóriumi fenntartásának egyszerűsége tette alkalmassá a fejlődésbiológiai vizsgálatokra. A *Coprinopsis* nemzetség a Basidiomycota törzs Agaricomycetes osztályán belül az Agaricales rend Psathyrellaceae családjába tartozik. A *C. cinerea* szaprotróf, a természetben gyakran trágyán található meg. Genomját 2003-ban szekvenálták meg: tizenhárom kromoszómával és kb. 12 450 génnel rendelkezik, genommérete 37 Mb (Stajich és mtsai., 2010).

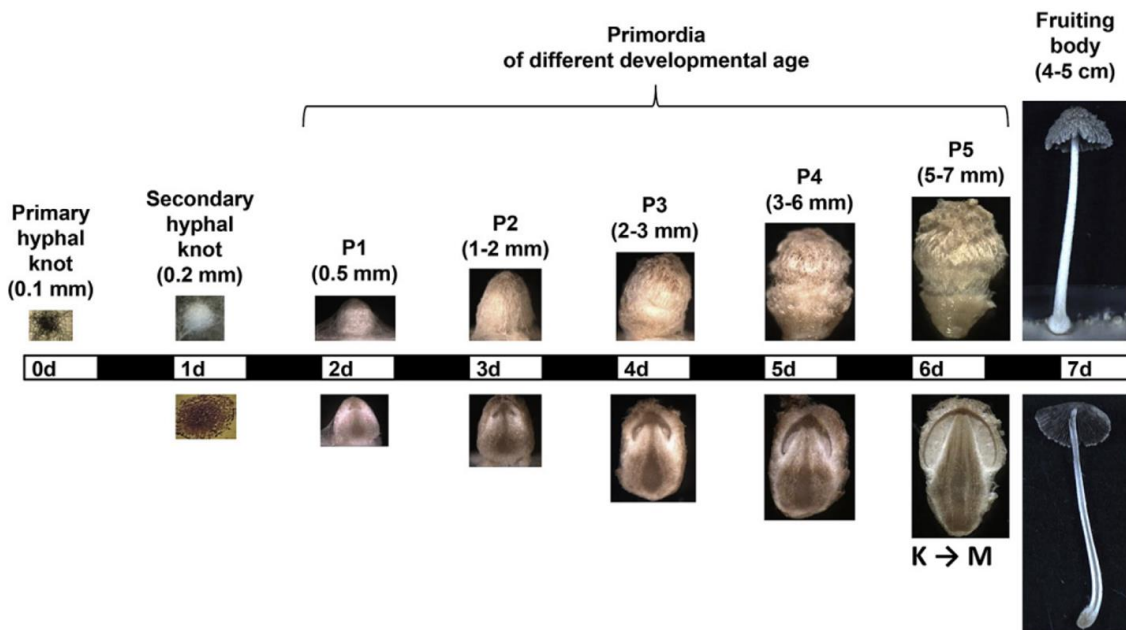
A *C. cinerea* vegetatív micéliumát mono- és dikariotikus hifák alkotják (primer és szekunder micélium) – bár szigorúan véve nem tesznek eleget a monokarion és dikarion definíciójának a magszámok bizonyos szintű változatossága miatt (Kües, 2000). A dikariotikus hifák vastagabbak és gyorsabb növekedésűek, mint a monokarionok. A dikarion kompatibilis monokarionok fúziójából jön létre. A kompatibilitást két polimorf géncsoport (A és B) határozza meg; polimorfizmusuk miatt a fajra legalább 12 000 párosodási típus jellemző. A kompatibilitás nem a hifafúzió, hanem a dikarion kialakulásának feltétele, inkompatibilis hifák fúziójából infertilis heterokarion jön létre (Casselton és mtsai., 1995). Az „A” gének homeodomain transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek kombinatorikus interakciója elindítja a dikarion fejlődési programot, a „B” gének pedig feromonreceptorokat kódolnak, melyek a dikarion életfázis fenntartásában játszanak szerepet. A dikarionra jellemző a csatképzés; ilyen hifákból képződnek a termőtestek is, bár laboratóriumi körülmények között már sikerült monokariotikus törzs termőtestképzését is indukálni (Kües, 2000). Leggyakrabban használt *C. cinerea* labortörzsek az adenin auxotróf okayama-7, valamint az önkompatibilis (tehát partner nélkül is dikariotizálódó), PABA-auxotróf AmutBmut, melyet az „A” és „B” lokuszok UV-mutagenézisével állítottak elő (Kües, 2000).

A *C. cinerea* háromféle spórát termel. A mono- vagy dikarionból a citoplazma kompressziójával létrejövő, a hifa folytonosságát megszakító mono- vagy dikariotikus klamidospórák, illetve a főként monokarionok által fényben nagy mennyiségben termelt, oidiofóron megjelenő, mindig monokariotikus oidiumok ivartalan szaporítóképletek, míg a termőtestek himéniumán képződő binukleát homokariotikus bazidiospórák ivaros szaporítóképletek (Kües, 2000).

A termőtestképzés éheztetéssel váltható ki. A termőtestfejlődés első stádiuma egy sűrű hifaszövedék, az elsődleges hifacsomó, mely sötétben jelenik meg. A termőtestképzés stádiumainak megnevezése nem konzisztens a szakirodalomban; az alábbiakban az Ursula Kües által használt újabb nevezéktant vettem alapul (Navarro-González és Kües, 2015) (2.

ábra). Az elsődleges hifacsomó fényben másodlagos hifacsomóvá alakul, fény hiányában viszont kitartóképlet, ún. szklerócium, jön létre belőle. A másodlagos hifacsomóra sűrűn elágazó, irányítatlanul növekvő hifák jellemzőek, melyek egyfajta térbeliséget hoznak létre. Kües a különböző primordiális stádiumokat a másodlagos hifacsomó megjelenése óta eltelt napok számában határozza meg (P1 – P5). Főként a primordiális stádiumokban zajlik a szöveti differenciáció. Először három régió különül el; az alsó régió, a bazális plektenchima poliszacharidokat halmoz fel, és ebből alakul ki a termőtest bázisát alkotó nodulusz. A másik két régióból alakul ki később a kalap és a tönk. A lemezek, illetve a vélum (burok) a P2-ben jelennek meg. Az általános burok körülveszi az egész primordiumot, a belső burok pedig a kalap és a tönk között alakul ki. A lemezeken helyezkedik el a himénium (termőréteg), melynek felépítésében több sejttípus is részt vesz: probazídiumok, steril hyphidiumok és távtartó sejtek, ún. cisztídiumok. A cisztídiumokkal érintkező probazídiumok, később nem bazídiumokká, hanem cisztéziumokká fejlődnek. A hármas stádiumú primordium már az érett termőtest „kicsinyített mása”, ebben a stádiumban növekszik a kalap. A tekintetben, hogy a primordium már tartalmaz minden, a kifejlett termőtestre jellemző struktúrát, illetve a környezettől elválasztva fejlődik, párhuzamba állítható az állati és növényi embriókkal (Virágh és mtsai., 2021). A primordiális fejlődés során a glikogénraktár a noduluszból fokozatosan áthelyeződik a himéniumba. A kariogámia és a meiózis a P4-ben zajlik; a P5-ben elkezd felszakadozni a vélum, innentől fiatal termőtestről beszélünk. A fiatal termőtest tönkje megnyúlik. Az érett termőtest Petri-csészén 4-5 cm magas, a természetben ennél nagyobbra nőnek. Az érett termőtestben befejeződik a bazidiospórák érése, a kalap elfolyósodik (autolizál) – innen a tintagomba elnevezés. Az elfolyósodás is konvergens jelleg a gombák körében, a tendenciát coprinoidizációnak nevezik. A primordiumok növekedéséhez is szükség van fényre; hiányában etiolált termőtestek (*dark stipe*) jönnek létre a nodulusz megnyúlásával, az apikális részen csak egy fejletlen kalapszerű képlettel. Az etiolált termőtest is termel bazidiospórát, viszont lényegesen kisebb mennyiségben, mint a fényen nevelt termőtest (Kües és Navarro-González, 2015, Kües, 2000).

Bár viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk a termőtestképzés alatt lejátszódó molekuláris történésekről, bioinformatikai és molekuláris eszközök segítségével sok génről és géncsaládról bebizonyosodott, hogy fontos szerepet játszik ebben a folyamatban. Ilyenek, a teljesség igénye nélkül, egyes sejtfelszíni fehérjéket (lektinek, hidrofobinok) kódoló gének, az olykor citoszkeletális komponensnek tekintett szeptinek vagy egyes, kitin- vagy glükánmetabolizmusban szerepet játszó gének (Nagy és mtsai., 2023). Az eddig ismert, termőtestképzésben részt vevő, konzervált gének többségét a *C. cinerea*-ban jellemezték.



2. ábra. A *C. cinerea* termőtestfejlődésének stádiumai, feltüntetve a képletek jellemző méretét, illetve a megjelenéshez szükséges időt (de Mattos-Shipley és mtsai., 2016).

2.4. A *Cryptococcus neoformans* ivaros életmenetének molekuláris háttere

A *Cr. neoformans* ismert opportunista humán patogén, a mikózisok és a gombák ivaros szaporodásának kutatása terén fontos modellorganizmus (Lin és Heitman, 2006). A *Cr. neoformans* fajaggregátum a Basidiomycota törzs Tremellomycetes osztályába tartozik, tehát modellfajunktól, a *C. cinerea*tól mintegy 350 millió évnnyi evolúció választja el (He és mtsai., 2019). Bár ivaros szaporítóképleteire a szakirodalom gyakran termőtestként hivatkozik, a faj nem rendelkezik komplex termőtesttel. Életmenete dimorf: vegetatívan az élesztőmorfológia, ivaros életszakaszában pedig fonalas növekedés jellemző. Kompatibilis élesztősejtek fúziója után dikariotikus hifák képződnek, melyek végén megjelennek a csupasz bazídiumok (Lin és Heitman, 2006). Az élesztőmorfológia konvergens, valószínűleg látens homológiára visszavezethető egyszerűsödés a gombák körében (Nagy és mtsai., 2014), ami a Basidiomycota klád közös ősére nem volt jellemző; viszont a csupasz, azaz nem komplex termőtesten megjelenő bazídiumok miatt a *Cr. neoformans* jó modellje lehet az ősi bazídiumos gombák ivaros szaporodásának.

A plazmogámia utáni események elindításában szerepe van a párosodási típust meghatározó lokuszoknak (*MATa* és *MATα*). A dimorf átmenet mesterregulátorának egy cinkujj doménnel rendelkező transzkripciós faktor (Znf2) tekinthető. A Pum1 Pumilio (PUF) fehérjecsaldba tartozó RNS-kötő fehérje amellet, hogy szerepet játszik a fonalas növekedés fenntartásában, pleiotróp szabályozóelemként több ivaros folyamatban is részt vesz, így pl. a

bazídiumérésben (Liu és mtsai., 2018). Az RRM (*RNA recognition motif*) családba tartozó, azaz ugyancsak RNS-kötő, Csa1 és Csa2 (*Cryptococcus sporulation activator*) fehérjék a meiózis és a bazídiumérés tér- és időbeli összehangolásáért felelnek. A *PUM1*, *CSA1* és *CSA2* gének bármelyikének kiütése rontja a sporuláció hatékonyságát; aberráns morfológiák jelentkeznek. A Pum1 szabályozza a *CSA1* és a *CSA2* kifejeződését, bár a pontos mechanizmus nem ismert: a *PUM1* deléciója esetén alacsonyabb, túlműködtetése esetén magasabb *CSA1*, illetve *CSA2* expresszió mérhető. A meiózis, a bazídiumérés és a sporuláció folyamataiban más, a Pum1-től downstream elemek is szerepet játszanak (Dmc1, Fas1, Dha1 and Fad1) (Liu és mtsai., 2018). A vegetatív fázis fenntartásának feltétele a *PUM1* autorepressziója (Kaur és Panepinto, 2016): élesztőtárában hosszabb, 5'-UTR-jében Pum1-kötő szekvenciát tartalmazó transzkriptum íródik át, a sejtfüzió után azonban a Znf2 hatására a *PUM1* átírása egy alternatív, downstream starthelyről indul, így megszűnik az önszabályozás. A fonalas morfológiát egy pozitív visszacsatolás állandósítja úgy, hogy a Pum1 fehérje stabilizálja a *ZNF2* mRNS-t. A Pum1 túltermeltetése partner hiányában nem indítja el a fonalas növekedést, hanem az élesztősejtek autodiploidizációját eredményezi (Kaur és Panepinto, 2016), kompatibilis partner jelenlétében azonban a párosodást gátló körülmények között is beindítja a fonalas növekedés (Wang és mtsai., 2014).

Az RNS-szabályozási hálózatok képesek újrarahuzalozódni, viszont feltételezhető, hogy az ismertetett rendszer valamilyen szinten konzervált. A következő fejezetben ismertetett koncepciónk szempontjából a *PUM1* és *CSA2* gének relevánsak, a *PUM1* ősi kópiája már a gombák közös ősében (Hegedüs és mtsai, 2021), a *CSA2*-é pedig legalább a bazídiumos és tömlősgombák közös ősében jelen volt (Liu és mtsai., 2018). A *Schizosaccharomyces pombe* *CSA2*-ortológjának terméke, a Mei2 a meiózis mesterregulátora. Számos Mei2 által kötött kódoló és nemkódoló RNS-t azonosítottak már. A meiózist úgy indítja be, hogy a plazmigámiát követően RNS- és fehérjeszinten is gátolja a meiózisspecifikus mRNS-eket eltávolító, egyébként nem konzervált Mmi1-et (van Werven és Amon, 2011). A Mei2 a sejtmagban fejti ki hatását, de nem rendelkezik magi lokalizációs szignállal (NLS), így egy hosszú nem kódoló RNS (meiRNS) pányvázza ki a DNS-hez (Yamashita, 2019). A *Saccharomyces cerevisiae* és *Sc. pombe* *PUM1*-ortológjainak termékei (Puf3p és Puf3) mitokondriális mRNS-eket kötnek (Kaur és Panepinto, 2016).

3. Hipotézis és célkitűzések

Ismereteink nagyon hiányosak a gombák komplex soksejtűségével kapcsolatban. Nem ismerjük, hogy evolúciósan miben gyökereznek a komplex struktúrákat kialakító fejlődési programok, és nem értjük a programok evolúciójának konvergens természetét sem.

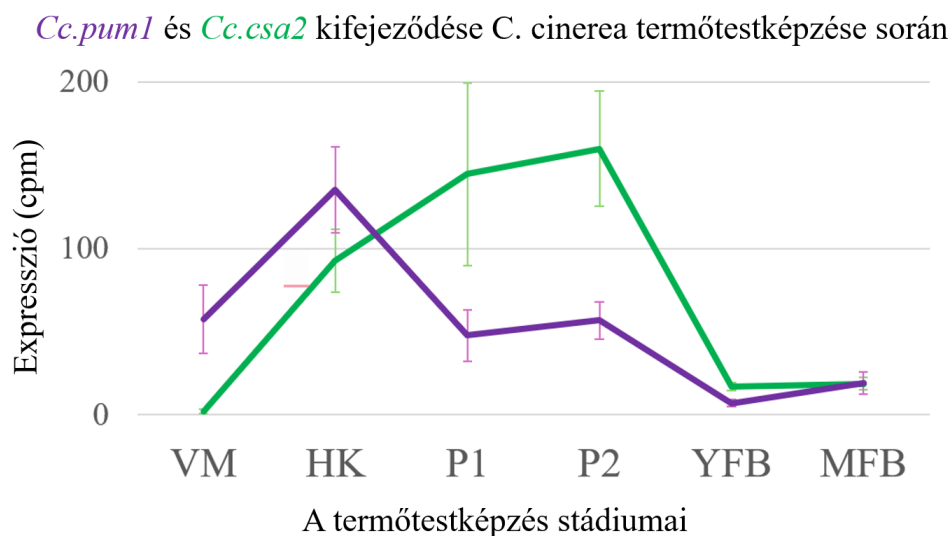
A *Cr. neoformans* bazídiumai csupaszok, nem rendelkeznek komplex termőtesttel, így az ivaros szaporítóképlet komplexitása szempontjából tekinthető az ősi bazídiumos gombák modelljének. Az ivaros folyamatok koordinációjában fontos szerepet játszanak a *PUM1* és *CSA2* RNS-kötő fehérjét kódoló gének, melyek igen konzerváltak. Ortológjaik megtalálhatók az Agaricomycotina kládban is; ezeket azonban idáig nem jellemezték. A *PUM1* expressziója a hifákban a legmagasabb, a *CSA2* kifejeződése pedig bazídiumspecifikus. Megvizsgáltuk modellfajunk, a *C. cinerea* *PUM1*- és *CSA2*-ortológjainak (*Cc.pum1* [CopciAB_354109] és *Cc.csa2* [CopciAB_193545]) kifejeződését. Az RNS-szekvenálási adatsorból (Krizsán és mtsai, 2019) (3. ábra) az látszik, hogy a *Cc.pum1* expressziója lecsökken a termőtestképzés során, expressziós maximumot a legkorábbi komplex stádiumban, a hifacsomóban (HK) mutat, bár egy másik adatsor szerint inkább a vegetatív micéliumban (Xie és mtsai, 2020). A *Cc.csa2* a hifacsomóban kezd el kifejeződni (3. ábra). Ez azért érdekes, mert a *Cc.csa2* a *Cr. neoformans* bazídiumspecifikus *CSA2* génjének ortológja, a *C. cinerea* hifacsomó stádiumában azonban még nincsenek bazídiumok. Tehát egy egyszerű soksejtű gomba bazídiumspecifikus génjének ortológja a komplex soksejtű fajban valószínűleg a termőtestképzésben játszik szerepet. Ez a váratlan expressziós mintázat vezetett el minket egy *evo-devo* hipotézis megfogalmazásához.

Úgy gondoljuk, hogy a Basidiomycota kládban a különböző termőtestsejtprogramok a bazídium fejlődési programjából jöttek létre, vagyis ***evo-devo* hipotézisünk szerint evolúciós megközelítésben a termőtestsejtek módosult bazídiumoknak tekinthetők**. A hipotézissel megkíséreljük rekonstruálni, hogy hogyan alakult ki a komplex soksejtűség a bazídiumos gombák körében legalább háromszor, és megpróbáljuk megérteni a feltételezett genetikai predispozíció természetét. A komplex soksejtűség jelensége nem csak a bazídiumos gombák leszármazási vonalán jellemző; a későbbiekben a hipotézis, különböző módosításokkal kiterjeszthető lehet. Hosszú távú célunk az ismertetett hipotézis tesztelése. Rövid távú **célkitűzésünk** (a hipotézis tesztelésének első lépéseként) a ***Cc.pum1* és *Cc.csa2* gének funkcionális jellemzése volt *C. cinerea* modellszervezetben**. Ezért az alábbi konkrét célokat fogalmaztuk meg:

(1) Kísérletesen tesztelni (génkiütéssel és -túlműködtetéssel), hogy a *Cc.pum1* és a *Cc.csa2* valóban szerepet játszanak-e a termőtestképzésben, ahogy azt a kifejeződési mintázatuk indikálja.

(2) Megvizsgálni, hogy a *Cc.pum1* expressziója miért csökken a termőtestképzés során: a termőtestképzést gátló funkciója van-e, vagy egyszerűen szükségtelenné válik a fejlődés kései stádiumaiban.

(3) Mivel a *Cr. neoformans*-ortológ pleiotróp regulátor, így célul tűztük ki *Cc.pum1*-re deléciós törzs transzkriptomanalízisét.



3. ábra. A *Cc.pum1* (lila) és *Cc.csa2* (zöld) gének kifejeződési dinamikája a *C. cinerea* termőtestképzése során. Rövidítések: VM: vegetatív micélium; HK: hifacsomó; P1: egyes stádiumú primordium; P2: kettes stádiumú primordium; YFB: fiatal termőtest; MFB: kifejlett termőtest. A fiatal és kifejlett termőtest stádiumoknál a különböző szövetekre (tönk, kalap, lemez) mért kifejeződési adatokat átlagolva ábrázoltam.

4. Anyagok és módszerek

Alkalmazott pufferek:

- Stock A (40-szeres töménységű): 40 g/l KH_2PO_4 , 90 g/l Na_2HPO_4 , 11,6 g/l Na_2SO_4 , 20 g/l nátrium-tartarát
- Stock B (1000-szeres töménységű): 40 g/l tiamin - sterilre szűrve
- Stock C (100-szoros töménységű): 12 g/l MgSO_4
- MM-puffer: 0,5 M mannit, 0,05 M nátrium-maleát
- MMC-puffer: 0,5 M mannit, 50 mM nátrium-maleát, 25 mM CaCl_2
- PBS: 1,94 g/l KCl, 80 g/l NaCl, 14,2 g/l Na_2HPO_4 , 2,4 g/l KH_2PO_4
- TAE (50-szeres töménységű): 40 mM Tris, 20 mM ecetsav, 1 mM EDTA
- lízispuffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,001% Triton X
- Cas9 reakciópuffer: 0,2 M HEPES, 0,1 M MgCl_2 , 5 mM DTT, 1,5 M KCl
- PEG- CaCl_2 -oldat: 250 g/l PEG-4000, 50 mM CaCl_2

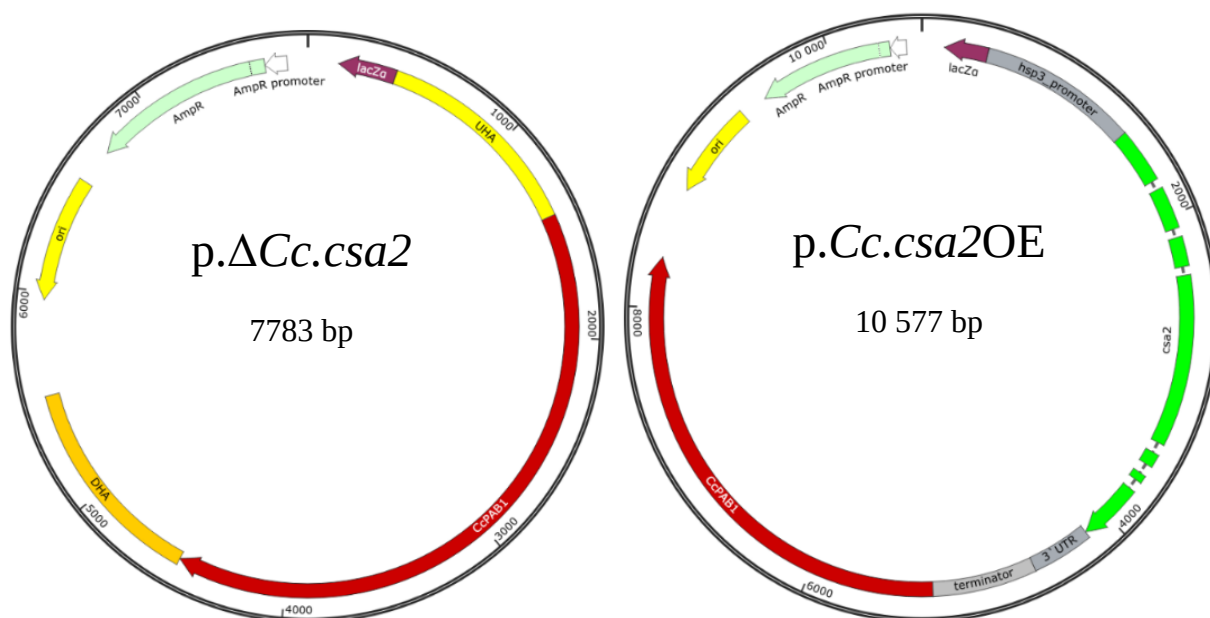
Alkalmazott táptalajok:

- LB: 10 g/l tripton, 2 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, szilárd táptalajhoz 20 g/l agar
- YMG: 4 g/l élesztőkivonat, 4 g/l glükóz, 10 g/l malátakivonat, szilárd táptalajhoz 10 g/l agar
– félcukros YMG táptalajban 2 g/l glükóz
- Minimál táptalaj: 2 g/l Asn, 10 g/l agar, 10 g/l glükóz (tízszeres töménységben külön klávozva), stockok (A, B, C) klávozás után
- Regmed: 2 g/l Asn, 172 g/l szacharóz, 5 g/l keményítő, 10 g/l agar, 4 g/l glükóz (tízszeres töménységben külön klávozva), stockok (A, B, C) klávozás után – A Regmed fedőagarban 8 g/l agar van.
- Fries (1 l-hez): 760 ml Fries A (2 g Asn, 0,5 g ammónium-tartarát, 1 g KH_2PO_4 , 2,25 g Na_2HPO_4 , 0,28 g Na_2SO_4 , 0,5 mg tiamin-HCl, 15 g agar) + 40 ml Fries B (0,1 g CaCl_2 , 0,41 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 5,31 mg vas(III)-citrát, 5,31 mg citromsav, 4,43 mg MnSO_4 , 4,05 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) + 20 g glükóz 200 ml vízben külön klávozva
- Vízagar: 10 g/l agar

A *C. cinerea* tenyésztése: Kísérleteimhez a *C. cinerea* AmutBmut pab1-1 törzsét használtam. Rendszerint idősebb tenyészetről agarkockával oltottam át 10 cm átmérőjű Petri-csészében lévő félcukros YMG talajra, és 28 °C-on, növénynevelő inkubátorban növesztettem a tenyészetet váltakozó fényen vagy sötétben.

Plazmidok összeszerelése: Összesen hat plazmidot alkalmaztam a munkám során (a két génre deléciós, komplementációs és overexpressziós plazmidok). A *Cc.pum1* deléciós

plazmidot a csoport korábbi munkatársa, Docsa Denissa építette össze (nem publikált). A plazmidokat a SnapGene program segítségével terveztük. A célzott géndeléciót a CRISPR-Cas9-hasítást követő homológ rekombinációs DNS-javítással terveztük megvalósítani, így a deléciós plazmidok homológ karok (a cél szekvencia elejétől upstream, és végétől downstream elhelyezkedő 1-1 kb szekvenciák) között hordozzák a markergént. A további plazmidjaink ektopikusan integrálódó plazmidok. A komplementációs plazmidok genomi konstrukciókat hordoznak, azaz a géneket a natív promóterük hajtja meg, míg az overexpressziós plazmidokon indukálható *Cc.hsp3* hősokk-promóter biztosítja a transzkripciót. Kétféle szelekciós rendszert használunk. A génkiütéshez és a túltermelő mutánsok előállításához használt plazmidok PABA-szintázt hordoznak (ami auxotrófiát komplementál); a komplementációs plazmidok pedig β -tubulin promóterrel és terminátorral ellátott hygromycin B rezisztenciakazettát. Két plazmid felépítését a 4. ábra mutatja.



4. ábra. A *Cc.csa2* gén kiütéséhez (balra) és túltermeltetéséhez (jobbra) használt plazmidok térképei.

A plazmidok összeszerelését a Gibson Assembly Cloning Kit (New England Biolabs) segítségével, a gyártó utasításai szerint végeztük. A fragmentumokat PCR-rel amplifikáltam, Phusion Plus DNS-polimerázt (Thermo Fisher Scientific) használva, a gyártó utasításainak megfelelő PCR-programmal. A vektorgerinceket és a PABA-kazettát funkcionális PABA-szintázt hordozó pUC19 plazmidról, a homológ karokat, a genomi konstrukciókat és a *Cc.hsp3* promótert pedig AmutBmut genomi DNS-ből. A PCR során alkalmazott primereket az 1. táblázat tartalmazza. A fragmentumok hosszát gélelektroforézissel ellenőriztem (1%-os agarózgélben, TAE-pufferben).

1. táblázat. Az általunk használt crRNS-ek és primerek szekvenciája.

crRNS-ek	
pum1_cr1	AGAGUGCCUCCCUAU
pum1_cr2	UCAACAAUAUUGCA
csa2_cr1	AGAUUAAACCCGCGG
csa2_cr2	ACUCGUGCAUCAUGG

Primerek a deléciós plazmidok fragmentjeihez	
pum1_UHA_F	TGCATGCCTGCAGGTCGACTGGAGGGGCTATTTGCGATCGGTACG
pum1_UHA_R	AGTTGCTTCGCACTCTGCAGCGGAAAGTAAAA
pum1_PABA_F	CTGCAGAGTGCGAAGCAACTGAAGGAGCG
pum1_PABA_R	CATCGGAGCTTTCTTCTGGCATCTTTCCTCCGAC
pum1_DHA_F	GCCAGAAGAAAGCTCCGATGTTAACTTCGCTATATGA
pum1_DHA_R	GGTACCCGGGGATCCTCTAGATCATTGCGGTAGTACGACGT
pum1_vector_F	CTAGAGGATCCCCGGGTACC
pum1_vector_R	AGTCGACCTGCAGGCATG
csa2_UHA_F	ATTTCGAGCTCGGTACCCGGGAGAGCGTAGTGTCCGAGGG
csa2_UHA_R	ACGCTCCTTCAGTTGCTTCGATAATCTGGGAGGTTTGTGAAATTGTTTG
csa2_PABA_F	TCACAAACCTCCCAGATTATCGAAGCAACTGAAGGAGCG
csa2_PABA_R	AAAATCTTGGGTGCGCATGATTCTTCTGGCATCTTTCCTCCGAC
csa2_DHA_F	GAGGAAAGATGCCAGAAGAATCATGGCGACCCAAGATTTTCTATT
csa2_DHA_R	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCAAAATTCAAACAGCGCGAAAGTATCA
csa2_vector_F	TTCGCGCTGTTTGAATTTTGGATCCTCTAGAGTCGACCTGC
csa2_vector_R	ACCCTCGGACACTACGTCCTCCCGGGTACCGAGCTCG

Ellenőrző primerek	
pum1_kulso_ell_F	CCCACATGCTGCCAAATTGCTTG
pum1_kulso_ell_R	TTGCACTGGCTGATACGCTCCA
pum1_belso_ell_F	CCGAGATAACTATGGTTGCCGCG
pum1_belso_ell_R	CTGAGGCTCCTCTGCCAAAGTC
csa2_kulso_ell_F	GCAAGTGATGTGTGACCAGTGACA
csa2_kulso_ell_R	CGGCACTTCTTCAGCTTCCTTGG
csa2_belso_ell_F	CCAAGTAGCCTTCGGGATGAAGCTT
csa2_belso_ell_R	CCACTTTGGCGATATACGCGATC

Primerek a túltermeltető plazmidok fragmentjeihez	
OEpum1_hsp3P_F	GCTCGGTACCCGGGGATCCTGAGCAGGGCCCAGG
OEpum1_hsp3P_R	CCGAATTGGAGGAGTGGCATCGTGTTTGGCGATAGGTTGATTGA
OEpum1_gen_F	ATCAACCTATCGCAAACACGATGCCACTCCTCCAATTCGG
OEpum1_gen_R	ACGCTCCTTCAGTTGCTTCGTCGTATGCTGATTGTTGGCCACC
OE_pum1_PABA_F	GGCCAACAA TCAGCATACGACGAAGCAACTGAAGGAGCG
OEpum1_PABA_R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGTTCTTCTGGCATCTTTCCTCCGACG
OEpum1_vector_F	GAGGAAAGATGCCAGAAGAACTAGAGTCGACCTGCAGGCA
OEpum1_vector_R	GCAACTCCTGGGCCCTGCTCAGGATCCCCGGGTACCG
OEcsa2_hsp3P_F	GCTCGGTACCCGGGGATCCTGAGCAGGGCCCAGG
OE_csa2_hsp3P_R	GCGGATGTTGGGCGGAGCATCGTGTTTGGCGATAGGTTGATTGA

OEcsa2_gen_F	ATCAACCTATCGCAAACACGATGCTCCGCCCAACATCC
OEcsa2_gen_R	ACGCTCCTTCAGTTGCTTCGGGGCATTGACTGCAATCCTCT
OEcsa2_PABA_F	GAGGATTGCAGTCAATGCCCCGAAGCAACTGAAGGAGCG
OEcsa2_PABA_R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGTTCTTCTGGCATCTTTCCTCCGACG
OEcsa2_vector_F	GAGGAAAGATGCCAGAAGAACTAGAGTCGACCTGCAGGCA
OEcsa2_vector_R	GCAACTCCTGGGCCCTGCTCAGGATCCCCGGGTACCG

Primerek a komplementáló plazmidok fragmentjeihez	
compl_pum1_gen_F	GCTCGGTACCCGGGGATCCTAGCGCCTACAATCGGAAAGGTA
compl_pum1_gen_R	CGTGAAGCCGTTTAAATGAATCGTATGCTGATTGTTGGCCAC
compl_pum1_hygro_F	GGCCAACAATCAGCATACGATTCAATTTAAACGGCTTCACGGG
compl_pum1_hygro_R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGCAATATTCATCTCTCCATCGAAGAT
compl_pum1_vector_F	CGATGGAGAGATGAATATTGCTAGAGTCGACCTGCAGGCA
compl_pum1_vector_R	CCTTTCCGATTGTAGGCGCTAGGATCCCCGGGTACCG
compl_csa2_gen_F	GCTCGGTACCCGGGGATCCTTGGCATTATATCATGGCTGTTCTAAGATCTACA
compl_csa2_gen_R	CGTGAAGCCGTTTAAATGAAGGGCATTGACTGCAATCCTTCT
compl_csa2_hygro_F	GAGGATTGCAGTCAATGCCCTTCATTTAAACGGCTTCACGGGC
compl_csa2_hygro_R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGCAATATTCATCTCTCCATCGAAGAT
compl_csa2_vector_F	CGATGGAGAGATGAATATTGCTAGAGTCGACCTGCAGGCA
compl_csa2_vector_R	ACAGCCATGATATAATGCCAAGGATCCCCGGGTACCG

qPCR primerek	
tub_RT_F	AACGACCTCCAGCTTGAAT
tub_RT_R	GTGAGTGGGTGATCTGGAAG
pum1_RT_F	CCTTTGCTTAAATCCCTTCCAGA
pum1_RT_R	TCACCTTCAGTTCCGCATCA
csa2_RT_F	TCCCAACTCAGCCTTCAATC
csa2_RT_R	ATGACCGTAGTCCTTGTATCCT

Baktériumtranszformáció, kolónia-PCR és plazmid DNS-tisztítás: Az összeszerelt plazmidokat kompetens NEB5α *E. coli* sejtekbe juttattam a következőkben leírtak szerint. A kompetens sejtekhez 5 µl reakcióelegyet mértem, majd fél órát jégen inkubáltam. 30 s 42 °C-on történő hőshokot követően 30 másodpercig ismét jégen inkubáltam. A sejteket rázóinkubátorban 950 µl SOC médiumban (New England Biolabs) regeneráltattam egy óráig 37 °C-on. Centrifugálás (2 perc, 2000 g) után folyékony LB-be vettem fel a sejteket, és 100 µg/ml végkoncentrációban ampicillint tartalmazó LB lemezekre szélesztettem ki őket. Másnap a felnőtt telepeket átoltottam egy friss lemezre. Mintavétel után feltártam a sejteket 15 µl lízispufferben, 5 perc 100 °C-on történő inkubációval, centrifugálással összegyűjtöttem a sejttermelékét (10 percig 23 000 g). Az ellenőrző PCR-t a felülúszóból mértem össze. A PCR alapján kiválasztott telepekből a Viogene Mini Plus Plasmid DNA Extraction System kit segítségével is végeztem plazmid DNS-tisztítást. A plazmidok ellenőrző szekvenálását a

Microsynth céggel végeztettük. A gombatranszformációhoz a Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Midi kittel tisztítottam nagy mennyiségű plazmid DNS-t.

Oidiumok protoplasztálása: A gombatranszformációhoz a sejtfal bontása szükséges. Transzformációnként 5-10 egyhetes, YMG táptalajon, 37 °C-on, állandó fényen nevelt tenyészetről gyűjtöttem oidiumokat úgy, hogy desztillált vízzel lemostam, 40 µm-es sejtszűrőn átszűrtem, centrifugálással összegyűjtöttem (1000 g, 10 perc), 5 ml MM-pufferrel átmostam, újra kiülepítettem, majd felvettem 1 ml sterilre szűrt, 2,5 m/V% VinoTaste-et (kereskedelmi forgalomban kapható sejtfalbontó enzimkeveréket) tartalmazó MM-pufferbe, és az oidiumokat 36 °C-on 70-90 fordulatszámon rázóinkubátorban rázattam 3-4 óráig. Rendszeresen mintát vettem, és mikroszkóppal ellenőriztem a protoplasztképződést. Mikor az oidiumok ~80%-a protoplasztálódott (aggregálódott), 5 ml MMC-pufferrel állítottam le a folyamatot, és kiülepítettem a protoplasztokat (1000 g, 15 perc).

Protoplasztálás micéliumból: Esetenként micéliumot is protoplasztáltam. A protokoll csak a leggyűjtésben tér el: 40 ml folyékony YMG-be oltottam le a gombát, rázóinkubátorban neveltem egy napig 37 °C-on, a kialakuló tömör micéliumot dörzsmozsárban üveggyöngyökkel fellazítottam, egy napig friss YMG-ben regeneráltattam 37 °C-on, majd leszűrtem a micéliumot és hozzáadtam az enzimtartalmú MM-puffert.

A CRISPR-Cas9 RNP-komplex összeszerelése: Az Alt-R s.p. Nuclease V3 (IDT) terméket használtuk az azonos gyártótól rendelt tracrNS-sel és duplex pufferrel. Összemértem 1,2 µl 100 µM crRNS-t, 1,2 µl 100 µM tracrRNS-t és 9,6 duplex puffert; az elegyet 95 °C-on 5 percig inkubáltam, majd 3-5 percig szobahőmérsékleten; 5 µg Cas9, 1,5 µl Cas9 reakciópuffer és 1 µl duplex puffer hozzáadása után 37 °C-on 15 percig inkubáltam. A crRNS-ek szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza.

A protoplasztok transzformációja: A kiülepített protoplasztokat transzformációnként 100 µl MMC-be vettem fel. Hozzáadtam 10 µg plazmidot, a génkiütések alkalmával génenként a 2-2 RNP-komplexet, valamint 30 µl PEG-CaCl₂-oldatot. 30 percig jégen inkubáltam a sejteket, majd 0,5 ml PEG-CaCl₂-oldat hozzáadását követően 10-20 percig szobahőmérsékleten. 20 ml MMC-puffer hozzáadása után óvatosan összekevertem. Kiülepítettem a sejteket (1000 g, 15 perc). PABA-szelekció esetén 1 ml MMC-be vettem fel, összekevertem a fedőaggarral, és kiöntöttem a Regmed-csészékre. Hygromycin B rezisztencián alapuló szelekció esetén, 15 ml MMC-pufferbe vettem fel a sejteket Regmed csészékre szélesztettem, majd másnap rétegeztem rájuk a 400 µg/ml végkoncentrációban hygromycin B-t (Invitrogen) tartalmazó fedőagart. A felnövő telepeket szelektív minimál táptalajt

tartalmazó plate-ekre gyűjtöttem. A transzformánsokat PCR-rel és genomszekvenálással (NovovGene) ellenőriztem.

Oidiáltatás: A kevert genotípusú tenyészeteket oidiáltatással tisztítottam. Oidiumokat gyűjtöttem a fentebb leírt módon; a szuszpenziót kihígítottam ~200 oidium/ml koncentrációra, 100-100 µl-t YMG lemezekre szélesztettem, a felnövő telepeket átoltottam és PCR-rel ellenőriztem.

RNS-tisztítás *C. cinerea*ból: Celofánon nevelt tenyészeteket folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban feltártam, a kivonáshoz a Zymo Quick-RNA MiniPrep kitet alkalmaztam.

RT-qPCR: A reverz-transzkripciót a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kittel (Thermo Fisher Scientific) végeztem, a qPCR-reakcióhoz az SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermixet (BioRad) alkalmaztam, mindkét termék esetén a gyártó utasításait betartva. Kontrollként vad típusú törzs RNS-kivonatát használtam, referenciagénnek a tubulint választottuk. Az expressziós változást a $FC=2^{-\Delta\Delta C_t}$ összefüggéssel számítottuk ki (Livak és Schmittgen, 2001). A qPCR-t *Cc.pum1*OE transzformánsokra háromszor, a *Cc.csa2*OE törzsekre kétszer végeztem el (technikai ismétlések).

A deléciós mutánsok genomanalízise: A teljesgenom-újraszekvenálást a NovoGene céggel végeztettük. Az adatok kiértékelésében dr. Bálint Balázs nyújtott segítséget. MultiQC-vel leellenőriztük a leolvasási minőségadatokat. A BbDuk szoftver segítségével eltávolítottuk a bizonytalan bázisleolvasásokat és az szekvenálóadapter-szekvenciákat (trimmelés), küszöbként 20-as Q-értéket állítottunk be. A leolvasásokat a bwa segítségével feltérképeztük egy, a csoportunkban 2022-ben elkészült *C. cinerea* referenciagenomra. A célterület delécióját vizuálisan ellenőriztük az IGV program segítségével. A szelekciós marker, a PABA-szintáz gén is feltérképeződik, mivel maga a gén jelen van az auxotróf labortörzsünkben, egy funkcióvesztéses allél formájában. A funkcióképtelen és a funkcióképes allélekről származó leolvasások arányából megbecsültük a szelekciós marker kópiaszámát a mutáns genomokban. A PABA-szintáz lokuszán (*pab1-1*, fehérjeazonosító: CopciAB_414607) jelentkező kiméra leolvasások nem illeszkedő szekvenciáira (*soft-clipped bases*) BLAST-tal rákeresve megállapítottuk az *off-target* integrációs helyeket.

A termőtestképzés és a telepmorfológia vizsgálata: Leggyakrabban az ún. szinkronizált termőtest-képzetési protokollt alkalmaztam, melynek lényege, hogy félcukros YMG-re oltottam a különböző törzseket, hat napig sötétben inkubáltam 28 °C-on, majd a tenyészetek felét áttettem váltakozó fényre, másik felét sötétben hagytam, és mindkét csoportot két hétig szintén 28 °C-on neveltem tovább. A deléciós mutánsokból ötven-ötven, a kiválasztott

túltermelő törzsekből száz-száz, a komplementált mutánsokból hat-hat tenyészetet fenotipizáltam. Minden esetben alkalmaztam vad típusú kontrollcsoportot. A túltermelő mutánsok esetén a termőtest-morfológiák megfigyelésén túl megszámláltam az 1 cm-nél hosszabb etiolált termőtesteket tenyészetenként. A deléciós mutánsoknál két másik irányított termőtest-képezetési protokollt is kipróbáltam. A „Fries-módszer” lényege, hogy a Fries talajon a csésze közepétől kb. 1,5 cm-re elhelyezett tárgylemezen lévő agarkockával indukálunk éhezést, a „vízagaros módszer” lényege pedig, hogy celofánra oltjuk a gombát, és hat nap után a félcukros YMG-ről átemeljük vízagarra, ugyancsak éhezést kiváltva ezzel. Mindkét protokollt kétszer ismételttem tíz-tíz tenyészettel. A deléciós mutánsok micéliumának nedvesíthetőségét úgy vizsgáltam meg, hogy vizet öntöttem a tenyészetekre és mikroszkóppal megfigyeltem a micélium viselkedését.

A micélium növekedési sebességének mérése: A $\Delta Cc.pum1$ és $\Delta Cc.csa2$ mutánsokból, valamint vadtypusból 20-20 félcukros YMG-lemezre oltottam le. Egy hétig minden nap ugyanazon időpontjában két merőleges tengely mentén bejelöltem a növekedés. A napi növekedési értékekre (mm) kétmintás t-próbát végeztem.

A csatképzés vizsgálata: A deléciós mutánsokat steril fedőlemezre növesztettem rá úgy, hogy a ráhelyezett, telepől kivágott korong mellé 50 μ l folyékony YMG-t csöpögtettem. 37 °C-on egy napig növesztettem, az agarkorongot pengével eltávolítottam, majd a visszamaradó micéliumhoz 50 μ l 10%-os KOH-oldatot, 50 μ l Calcofluor White festéket, 100 μ l PBS-t, végül a folyadék leitatása után 30 μ l glicerint és PBS-t tartalmazó fixáló oldatot adtam. A preparátumokat fluoreszcens fázis-kontraszt mikroszkópiával vizsgáltam.

A $\Delta Cc.pum1$ transzkriptomanalízise

Tíz-tíz félcukros YMG-lemezre oltottam le $\Delta Cc.pum1$ és vad típusú *C. cinerát*, melyeket hat és fél napig neveltem sötétben 28 °C-on, öt-öt tenyészetet a hat és fél nap lejárta után mintáztam, a maradékot pedig hatórányi fényindukciónak tettem ki, és azután mintáztam a telep szélétől 1,5 cm-re belógó tompaszögű háromszög sablon segítségével. A mintákat lefagyasztottam folyékony nitrogénben. A mintákból kinyert RNS integritását gélelektroforézissel ellenőriztem. Mind a négy csoportból három mintát küldtük el szekvenálásra.

A transzkriptomanalízisben dr. Bálint Balázs segített. Minőségellenőrzést követően BbDuk-kal eltávolítottuk a bizonytalan bázisleolvasásokat (trimmelés), küszöbként 20-as Q-értéket állítottunk be. A STAR szoftver segítségével *C. cinerea* genomra térképeztük a

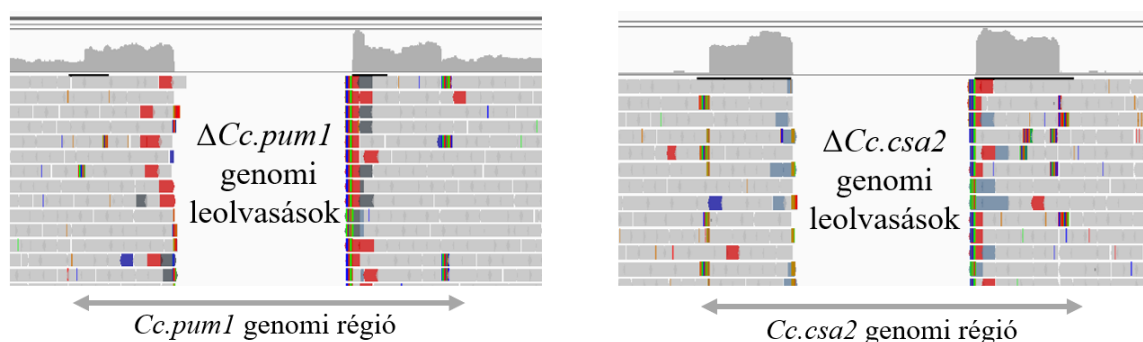
leolvasásokat, egykörös illesztésben. A feaureCounts programmal összeszámoltuk az adott lokuszokra eső leolvasásokat. Könyvtárméretre normalizáltunk. 2 cpm felett tekintettük kifejeződőnek a géneket. Dimenziócsökkentéssel ábrázolási módszerrel (MDS-plot) és hierarchikus klaszterezéssel (hőtérkép) meggyőződünk arról, hogy a csoportokon belül a minták egymáshoz nagyon hasonló expressziós mintázatot mutatnak. Az edgeR számára definiáltuk a kontrasztmátrixokat, és minden csoportot minden csoporttal összevetettünk. A DEG-eket (eltérően kifejeződő gének) szimmetrikusan, $FC \geq 2$ kifejeződési küszöb alapján határoztuk meg. Az összehasonlításokat UpSet-ábrákkal vizualizáltuk.

Funkcionális vizsgálatok: A TopGO segítségével GO-analízist (*Gene Ontology Term Enrichment Analysis*) hajtottunk végre a DEG-eken. Figyelembe vettük a GO-hierarchia mindhárom divízióját (sejtkomponens, molekuláris funkció, biológiai folyamat). A hagyományos 5%-os szignifikanciaszint alatt tekintettük megbízhatónak a találatokat. A DEG-ekre KEGG-analízist is végeztünk. Itt is az 5% alatti p-értékkel rendelkező találatokat tekintettük szignifikánsnak. Fisher-féle egzakt próbával leteszteltem, hogy a metabolikus gének dúsulnak-e a DEG-ek között. A GO- és KO-találatok alapján manuális annotációt végeztünk. Alapul vettünk a csoport által korábban összeállított fehérjelistákat (pl. növényisejtfal-bontó enzimek (PCWDE), autofágia, szénhidrát-metabolizmus) és magunk is összeállítottunk újabbakat a szakirodalomból és meglévő listákból homológia- és doménalapú keresésekkel (pl. antioxidáns rendszer, β -1,6-glüán-metabolizmus, β -1,3-glüán-metabolizmus). A hőtérképeket a heatmapper.ca segítségével készítettem el.

5. Eredmények és diszkusszió

5.1. A *Cc.pum1* és a *Cc.csa2* gének deléciója és a mutánsok jellemzése

Azonosítottuk a *Cr. neoformans* *PUM1* és *CSA2* gének ortológjait *C. cinerea*-ban. A MycoCosm adatbázisban (https://mycoCosm.jgi.doe.gov/Copci_AmutBmut1/Copci_AmutBmut1.home.html) a *Cc.pum1* genomi pozíciója: 2. kromoszóma 1602058-1604971 [+ szál]; a *Cc.csa2* genomi pozíciója: 4. kromoszóma, 1567056-1570226 [+ szál]. A CRISPR-Cas9 genomeditálási módszerrel külön-külön deletáltam a két RNS-kötő fehérjét kódoló gént. A DNS-szerkesztési eseményeket teljesgenom-újraszekvenálással igazoltuk: a céllokuszokra nem térképeződnek leolvasások (5. ábra).



5. ábra. *Cc.pum1* és a *Cc.csa2* lokuszok a $\Delta Cc.pum1$ (baloldalt), illetve a $\Delta Cc.csa2$ (jobbaldalt) mutánsokban, IGV-ben megjelenítve. A célszekvenciákra nem térképeződnek leolvasások, ami igazolja a génkiütéseket.

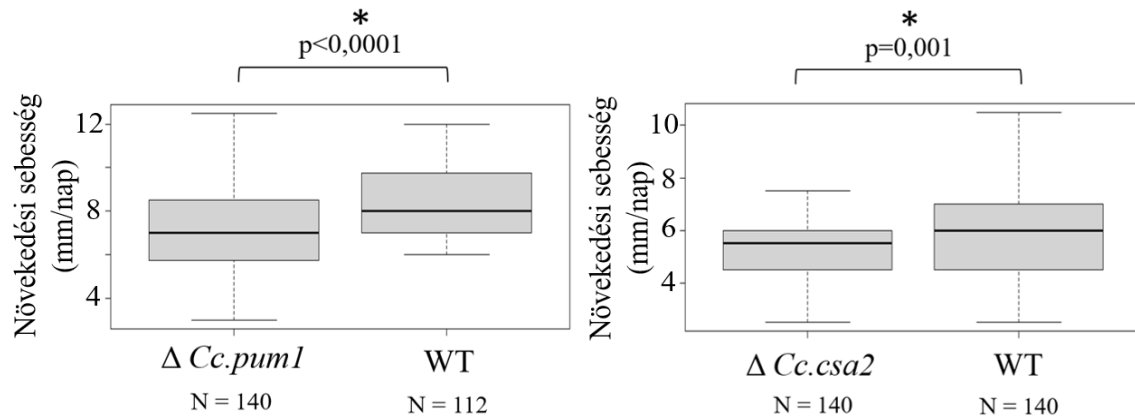
A referenciagenomon a homológ karoknak megfelelő szekvenciák magas lefedettsége (5. ábra) alapján arra következtettünk, hogy nemcsak homológ rekombináció következett be, hanem a konstruktok integrációja is. A PABA-szintáz SNP-allélarányai alapján megállapítottuk, hogy a szelekciós marker a $\Delta Cc.pum1$ mutánsban háromszor, a $\Delta Cc.csa2$ mutánsban tizenegyszer integrálódott. Megvizsgáltuk a PABA-szintáz génjére részlegesen térképeződő kiméra leolvasások nem illeszkedő szekvenciáit (*soft-clipped bases*), melyek alapján megállapítottuk az integrációs helyeket. A $\Delta Cc.csa2$ mutáns genomjában a szelekciós marker nem „szomszédos” szakaszait tartalmazó kiméra leolvasások arra engednek következtetni, hogy a *pab1-1* génszakaszok töredékesen egymásba is beépültek. Ez a jelenség, illetve a teljes konstrukciók integrációja magyarázatot adhat arra, hogy PCR-rel miért nem tudtuk sokszori próbálkozásra sem amplifikálni a régiókat egyik deléziós törzsben sem. A $\Delta Cc.csa2$ genomjában a szelekciós marker minden kiméra leolvasása a marker nem szomszédos részeiről vagy a homológ karokról származik, ektopikus integrációból származó kimérát nem detektáltam, a $\Delta Cc.pum1$ genomjában viszont kettőt is. Az egyik lokusz egy C2H2 cinkujj doménnel rendelkező fehérjét kódol (fehérjeazonosító: CopciAB_455447),

mely gén vad típusban nem mutat dinamikát a termőtestképzés korai szakaszaiban, a vegetatív micéliumtól a fiatal termőtest stádiumig közepesen expresszálódik (50 és 80 cpm között), csak az érett szövetekben jellemző magasabb expresszió (Krizsán és mtsai., 2019. publikált adatsorából). A másik lokusz egy HEAT ismétlődéseket tartalmazó fehérjét kódol (fehérjeazonosító: CopciAB_414604), melynek a termőtestfejlődés során nem változik jelentősen az expressziója (~20-30 cpm).

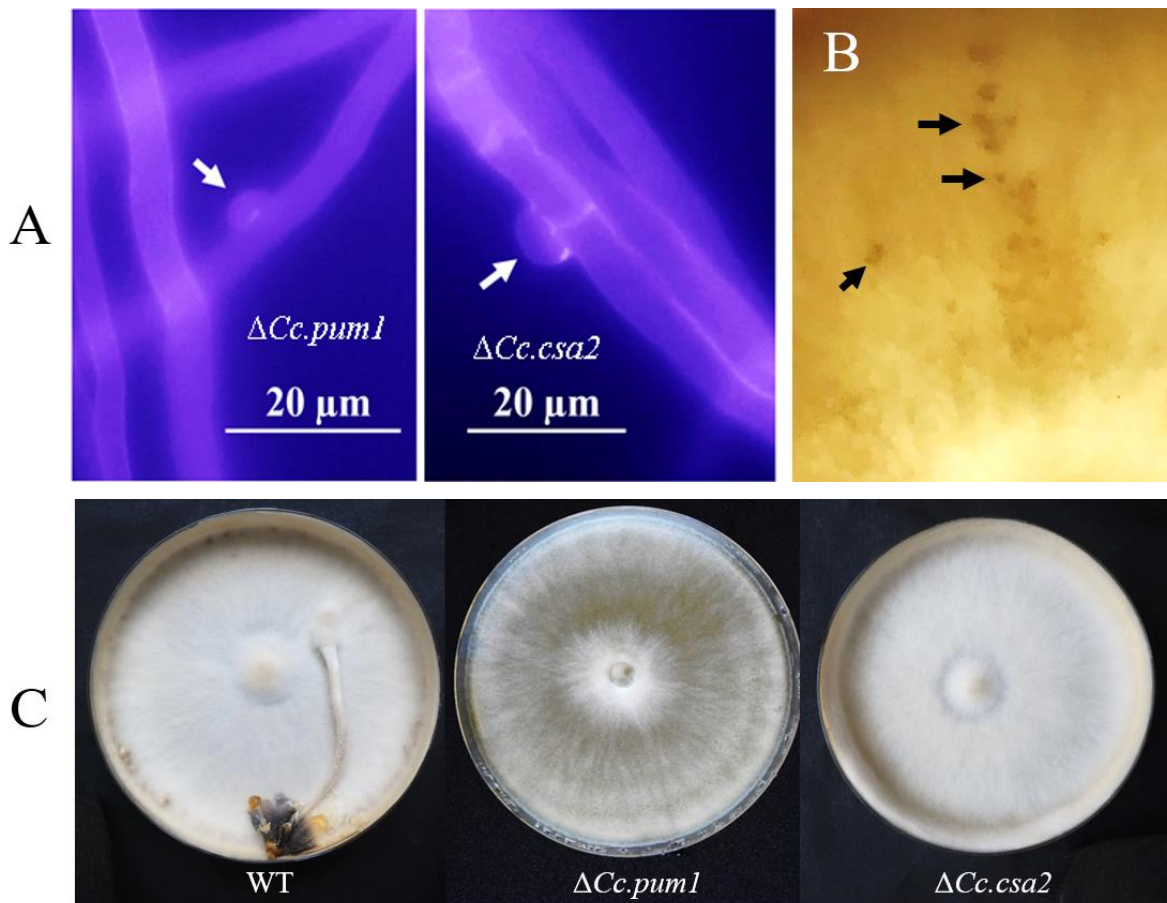
Mindkét deléciós mutáns szignifikánsan lassabban nő, mint a vad típusú törzs (6. ábra). A $\Delta Cc.pum1$ tenyésztete egészségtelen megjelenésű, kevés légmicéliumot fejleszt, és gyakran „gátlási zónák” figyelhetők meg (7.C ábra). Vízet öntve a tenyésztetre, a gátlási zónák körül igen lassan kezd átnedvesedni a micélium. Nem tekinthető klasszikus nedvesíthető fenotípusnak, mert csak mikroszkóppal követhető. Sejtfalfestéssel és fluoreszcens mikroszkópiával meggyőződtem róla, hogy mindkét mutáns képes csatképzésre (7.A ábra), azaz megvalósul a plazmogámia, és kialakul a dikarion. Mindkét mutánsban zavart szenved az oidiumképzés; a vad típushoz képest szemmel láthatóan jelentősen csökkent az oidiumok mennyisége (a kvantitatív mérés még folyamatban van). A hipotézisünk szempontjából a legfontosabb fenotípus a termőtestképzés zavara (7.C ábra). A $\Delta Cc.pum1$ törzs tenyésztetein egyik termőtest-képzetési protokoll (szinkronizált, „vízagaros” és Fries-módszer) alkalmazásakor sem figyeltem meg semmilyen komplex struktúrát: fényben és sötétben nevelve sem képez termőtesteket. $\Delta Cc.csa2$ mutáns tenyésztetein a szinkronizált termőtest-képzetési protokoll alkalmazásakor sötétben szkleróciumokat figyeltem meg (7.B ábra). A szkleróciumok az elsődleges hifacsomóból fejlődő kitartóképletek (Kües, 2000), tehát bizonyítékai annak, hogy a termőtestképzés elindul. A fényen nevelt $\Delta Cc.csa2$ tenyészteteken csak elvétve találtam hifacsomót, melyek nem fejlődtek tovább. A deléciós fenotípusok alapján, a *Cr. neoformans*-nál leírtakhoz hasonlóan (Liu és mtsai, 2018), valószínűsíthető, hogy a *Cc.Pum1* a termőtestképzés korábbi folyamataiban vesz részt, mint a *Cc.Csa2*.

A deléciós fenotípusok (az overexpressziós fenotípusokkal összhangban) illeszkednek előzetes koncepciónkba, illetve a nem szándékosan kiütött gének vad típusú expressziós mintázata alapján sem valószínű, hogy a deléciós fenotípus mögött az *off-target* hatások állnak. A célgén hiánya és a megfigyelt fenotípusok közötti okozati összefüggés bizonyítására célul tűztük ki a deléciós mutánsok komplementációját. A mutánsok csökkent oidiumtermelése és életképessége miatt a kiütött gének visszajuttatása bonyolult feladat volt, és többszöri próbálkozásra is csak a $\Delta Cc.pum1$ törzs komplementációja sikerült. Öt olyan transzformánst találtam, melyek micéliuma egészségesnek tűnt, azaz a micéliális fenotípus

menekítése megtörtént, viszont ezeknél a törzseknél sem váltható ki a termőtestképzés. A fenotípusok validálása céljából a későbbiekben további deléciós törzseket állítunk elő, illetve megpróbáljuk a géneket natív helyükre reintegrálni a CRISPR-Cas9 rendszer segítségével.



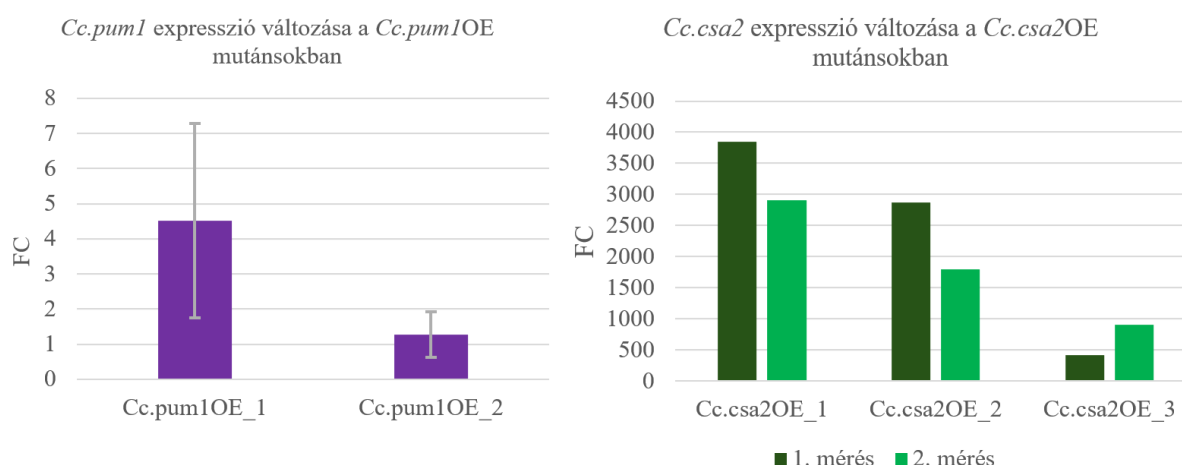
6. ábra. A deléciós mutánsok növekedési sebességének összehasonlítása a vad típusával (WT), dobozábrákkal szemléltetve. Az N az adatpontok számát jelöli, húsz tenyészet növekedését mértem hét napig (140 adatpont). A $\Delta Cc.pum1$ -gyel való összehasonlításban a WT kontrollcsoportban azért volt kevesebb adatpont, mert a tenyészetek már a hetedik nap előtt elérték a Petri-csésze szélét. Az adathalmazokat kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze.



7. ábra. (A) Fluoreszcens mikroszkópos felvételek a $\Delta Cc.pum1$ (baloldalt) és a $\Delta Cc.csa2$ (jobbaldalt) törzsek micéliumáról. A fehér nyilak a csatsejtekre mutatnak. **(B)** Szkleróciumok a $\Delta Cc.csa2$ tenyészetén. A fekete nyilak néhány szkleróciumra mutatnak. **(C)** Fényképek fényen nevelt vad típusú, $\Delta Cc.pum1$ és $\Delta Cc.csa2$ tenyészetekről a szinkronizált termőtest-képzetési protokoll alkalmazása után. A deléciós mutánsok nem képeznek termőtestet.

5.2. A *Cc.pum1* és a *Cc.csa2* gének túlműködtetése

Ektopikusan integrálódó plazmidok segítségével *Cc.hsp3* hősokk-promóterrel kifejeztetett kópiákat juttattam az AmutBmut törzsbe. RT-qPCR-rel megmértem a micéliumban való kifejeződést. Két *Cc.pum1*OE és három *Cc.csa2*OE transzformánst választottam ki fenotipizálásra az FC-értékek alapján (8. ábra). A vad típusú micéliumban magas a *Cc.pum1*, és alacsony a *Cc.csa2* kifejeződése (3. ábra); ez az oka annak, hogy több nagyságrendbeli különbség van a mért FC-értékek között a kétféle mutánsban. Előkísérleteim alapján nem volt szükség naponta hősokkknak kitenni a tenyészeteket a fenotipizálás során (a *Cc.hsp3* promóter 42 °C-on a legaktívabb), mivel ez a promóter 28 °C-on is magasabb kifejeződést biztosít, mint a gének saját promóterei. További előzetes kísérleteim alapján a két *Cc.pum1*OE törzs, illetve a három *Cc.csa2*OE törzs a vad típushoz képest ugyanolyan eltéréseket mutat, így a fenotípusok robusztussága miatt mindkét csoportból csak azzal a genotípussal dolgoztam tovább, amelyekre a legmagasabb FC-értékeket mértem.



8. ábra. A túlműködtetett gének kifejeződése a fenotipizálásra kiválasztott két *Cc.pum1*OE és három *Cc.csa2*OE törzs micéliumában a vad típusú micéliumhoz viszonyítva (FC) RT-qPCR alapján. A *Cc.pum1*OE transzformánsok esetén átlagoltam a három mérési eredményt, és feltüntettem a szórást; a *Cc.csa2*OE transzformánsok esetén pedig a törzsenkénti két mérési eredményt külön tüntettem fel.

Érdekes módon a *Cc.pum1*OE és a *Cc.csa2*OE törzsek egymáshoz nagyon hasonló fenotípusbeli változásokat mutattak. Méréseim szerint a mutánsok sötétben nevelve tenyészetenként szignifikánsan több 1 cm-nél magasabb etiolált termőtestet fejlesztenek (9.A és B ábrák), kiváltképp igaz ez a *Cc.pum1*OE törzsre, ahol Petri-csészénként átlagosan 7,5-szer több ilyen termőtestet számoltam, mint a vad típusnál. Valószínűsíthető, hogy az 1 cm-nél kisebb fejlett és fejletlen termőtestekből is több van a mutáns telepeken; ezeket viszont az összetekeredésük és micéliumba ágyazottságuk miatt nem lehetett megszámolni. A fényen nevelt tenyészetek esetén a P4 és P5 stádiumú primordiumokat, a fiatal és az érett termőtesteket együtt számoltam össze, tehát azokat a struktúrákat vettem figyelembe, melyek

már legalább elkezdtek emelkedni a táptalajtól. A P4 vagy annál fejlettebb termőtestek számában nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a mutánsok és a vad típus között.

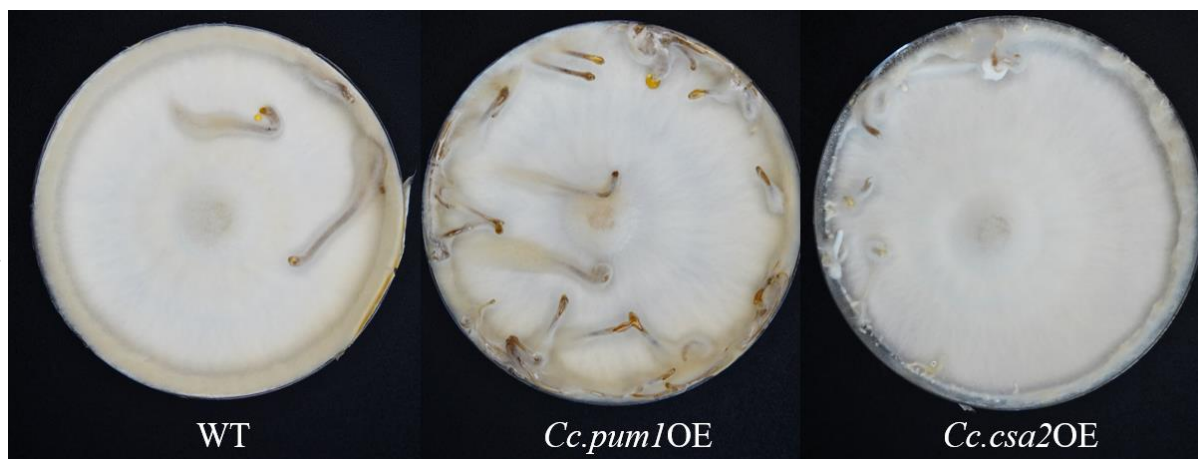
A túltermelő mutánsoknál ún. *soft* fenotípusokat is megfigyeltem, melyek tehát ritkán jelentkeznek, így statisztikai tesztek nem lehet rájuk végezni, viszont tapasztalataim szerint csak a mutánsokban jelentkeznek, vagy a mutánsokban jelentősen gyakrabban. Csak a mutáns tenyészeteken láttam elágazó termőtesteket (9.D ábra). Az elágazó morfológiák jelentkeztek a fényen és a sötétben nevelt tenyészeteken is. Az elágazás különböző fejlődési állapotokban következhetett be (9.D ábra): dokumentáltam például olyan etiolált termőtesteket, melyek csúcsukban ágaztak el; olyan apró, de kifejlett sötétben képzett termőtestet, mely egy méretesebb etiolált termőtest csúcsából nőtt ki, valamint mind a váltakozó fényben, mind a sötétben nevelt tenyészeteken előfordultak elágazó tönkű termőtestek. Az elágazások dedifferenciációra és a termőtest fejlődési programjának lokális újraindulására utalhatnak. Ezek alapján a két RNS-kötő fehérjének a termőtestképzés legkorábbi stádiumaiban van szerepe.

A mutánsok etiolált termőtesteik gyakran összetapadnak, egymásra tekerednek, és olyan amorf képződményeket hoztak létre, melyekben az egyedi termőtestek nem elkülöníthetők (9.C ábra). Sötétben nevelve olykor a vad típusú *C. cinerea* is fejleszt robusztus, hosszú és vastag, horizontálisan növvő etiolált termőtesteket, melyek gyakran a Petri-csésze széle mentén nőnek. Megfigyeléseim szerint a mutánsok gyakrabban fejlesztenek ilyen „kúszó” termőtesteket. Ezek némelyik elérte a 20 cm-t is, szinte körbenöve a csészét (9.E ábra).

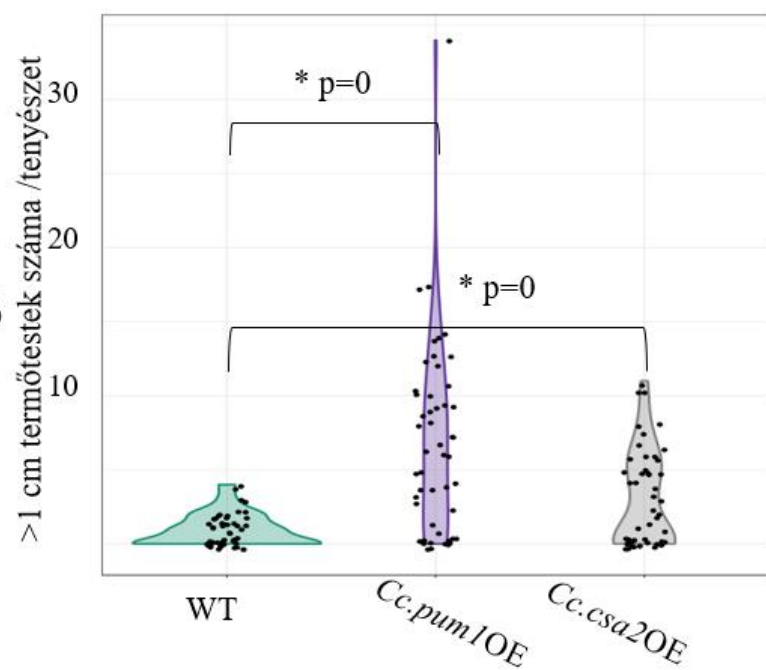
A *Cc.pum1OE* fenotípusai alapján megválaszolhattuk azt a kérdésünket is, hogy miért csökken le a *Cc.pum1* expressziója a termőtestképzés során. Mivel konstansan magasan tartott expresszió mellett is kifejlődnek a termőtestek, gátló hatásról nem beszélhetünk, valószínűleg a *Cc.Pum1* fehérje feleslegessé válik, nincs rá szükség a termőtestképzés kései eseményeihez.

Az egyszerű soksejtű *Cr. neoformans* *PUM1* és *CSA2* génjei az ivaros életmenetben játszanak szerepet, a *CSA2* a meiózis és a bazídiumérés koordinációjáért felel (Liu és mtsai, 2018). Kísérleti eredményeink, a deléciós és overexpressziós fenotípusok bizonyítják, hogy a komplex soksejtű *C. cinerea*-ortológok (*Cc.pum1* és *Cc.csa2*) szerepet játszanak a termőtestképzésben, így kísérletesen megtámogattuk a bazídiumos gombák komplex soksejtűségének eredetére vonatkozó *evo-devo* hipotézisünket, melyet ez idáig csak expressziós adatokra alapoztunk.

A

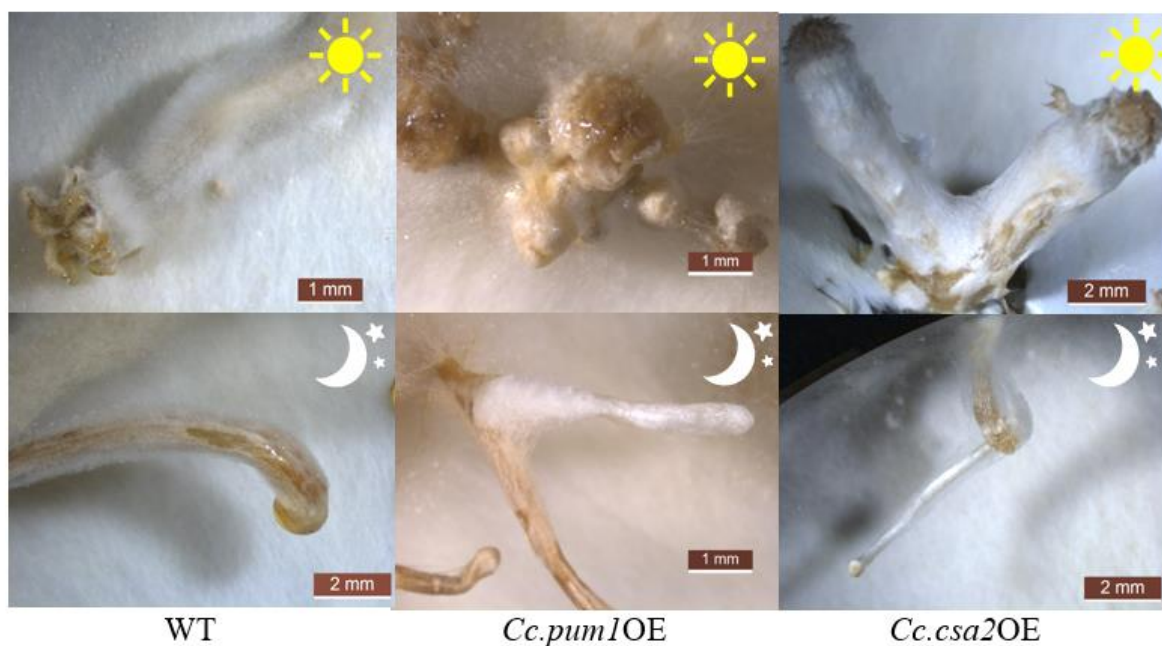


B



Cc.pum1OE

D



E



9. ábra. (A) Sötétben nevelt vad típusú, *Cc.pum1OE* és *Cc.csa2OE* tenyészetek összehasonlítása. **(B)** A sötétben nevelt vad típusú, *Cc.pum1OE* és *Cc.csa2OE* tenyészetek által fejlesztett 1 cm-nél magasabb etiolált termőtestek számának eloszlását szemléltető violin plotok. Az adatsokaságokat páronként kétmintás t-próbával hasonlítottam össze. **(C)** Összenőtt etiolált termőtestek. A képződmény alsó részén nem különíthetők el az egyedi termőtestek. **(D)** Elágazó mutáns termőtest-morfológiák nem elágazó vad típusú termőtestek mellett. A piktogramok azt szemléltetik, hogy a tenyészeteket váltakozó fényben vagy állandó sötétben neveltem. **(E)** Robusztus, „kúszó” etiolált termőtestek. A jobboldali képen egy kb. 20 cm hosszú „kúszó” termőtest látható, mely a Petri-csésze fala mentén nőtt.

5.3. A $\Delta Cc.pum1$ mutáns transzkriptomanalízise

Hat mutáns és hat vad típusú (három sötétben nevelt és három fényindukciónak kitett) tenyészetből kivont RNS-t küldtünk el szekvenálásra. Kétszeres küszöbnél a mutáns – vad típus összehasonlításban a sötétben nevelt tenyészetek esetén a mutánsban 829 gén expressziója szignifikánsan alacsonyabb, 1305 géné magasabb; a fényindukciónak kitett minták esetén pedig a mutánsban 1171 gén mutat alacsonyabb és 1268 gén magasabb kifejeződést. Mind a mutánsban alul-, mind az abban túlműködő gének között nagy az átfedés a két kondícióban (Jaccard-index(alulszabályozódó gének) = 0,4738; Jaccard-index(túlműködő gének) = 0,5416)) (10.A ábra). Ha az összehasonlításban a genotípus a változó, nagyobb az eltérően kifejeződő gének (DEG) száma, mint abban az esetben, amikor a tenyésztési körülményt (váltakozó fényen vagy sötétben való nevelés) választjuk változónak.

Az elsődleges hifacsomók szabad szemmel nem láthatók, mikroszkóppal sem mindig egyszerű a detekciójuk. Éppen ezért transzkriptomikai bizonyítékot kerestünk arra, hogy a $\Delta Cc.pum1$ deléciós mutánsban már a termőtestképzés kezdeti lépései sem valósulnak meg. A galektint kódoló *Cc.cgl2* gén hifacsomó-specifikus markernek tekinthető (Nagy és mtsai., 2023). A mutáns micéliumban nem volt mérhető az expressziója, mely adat validálja a megfigyelt fenotípust (10.B ábra). A *Cc.csa2* kifejeződése a *Cc.pum1* gén meglététől függetlenül micéliumban az expressziós küszöb (2 cpm) alatt van.

A szignifikánsan eltérően kifejeződő génekre GO-kifejezés dúsulási analízist végeztünk. AZ 5%-nál kisebb p-értékkel rendelkező GO-kifejezéseket manuálisan csoportokba rendeztem az alapján, hogy mely DEG-ekhez tartoznak ezek a bejegyzések. A mutánsban alulszabályozódó gének szignifikáns génontológiai kifejezéseit néhány csoportba be lehet sorolni (2. táblázat): ilyenek a sejtfallal, a glikozil-hidroláz aktivitással vagy a vasanyagcserével kapcsolatos bejegyzések. A mutánsban túlműködő génekhez sokkal többféle GO-kifejezés tartozik. A teljesség igénye nélkül olyan csoportokat alakítottam ki, mint a vitamin-, bázis-, és kofaktorszintézis, aminosavsintézis és glioxilát-ciklus.

2. táblázat. A sötétben nevelt *ΔCc.pum1* mutáns (sötétben nevelt vad típushoz képest) alulszabályozott génjeinek szignifikánsan dúsuló génontológiai kifejezései. A színek a géncsoportok egyezősége vagy jelentős átfedése alapján manuálisan alkotott csoportokat jelölik. Rövidítések: BP: biológiai folyamat; MF: molekuláris funkció; CC: sejtkomponens.

Aspektus (BP, MF, CC)	ID	Leírás	Génarány	p-érték
BP	GO:0055085	transzmembrán transport	35/181	$1,44 \times 10^{-6}$
BP	GO:0005976	poliszacharid-metabolizmus	13/181	$6,43 \times 10^{-5}$
BP	GO:0000272	poliszacharid-katabolizmus	10/181	0,000104
BP	GO:0005975	szénhidrát-metabolizmus	26/181	0,000167
MF	GO:0016798	hidroláz aktivitás, glikozilkötéseken	20/322	0,000998
MF	GO:0004553	hidroláz aktivitás, O-glikozil vegyületek hidrolízise	20/322	0,000464
CC	GO:0005618	sejtfal	11/120	$1,23 \times 10^{-8}$
CC	GO:0030312	belső elválasztó struktúra	11/120	$1,23 \times 10^{-8}$
CC	GO:0009277	gomba sejtfal	10/120	$9,54 \times 10^{-8}$
CC	GO:0071944	sejtperiféria	22/120	$6,3 \times 10^{-5}$
MF	GO:0005199	sejtfal struktúrelemei	9/322	$5,66 \times 10^{-5}$
MF	GO:0004609	foszfatidilszerin-dekarboxiláz aktivitás	5/322	$4,77 \times 10^{-5}$
MF	GO:0004601	peroxidáz aktivitás	8/322	0,000287
MF	GO:0016684	peroxidáz aktivitás, peroxid akceptoron	8/322	0,000287
MF	GO:0020037	hem kötés	38/322	0
MF	GO:0046906	tetrapirrol kötés	38/322	0
MF	GO:0004497	monooxigenáz aktivitás	34/322	0
MF	GO:0005506	vasion kötés	33/322	0
MF	GO:0016705	oxidoreduktáz aktivitás, molekuláris oxigén redukciójával	34/322	$1,6 \times 10^{-10}$

KEGG-analízist is végeztünk. A mutánsban alulszabályozott gének dúsuló KO-kifejezéseinek listájában a legmegbízhatóbb találatok között van a „keményítő- és szacharózmétabolizmus”, amely a glikogénmetabolizmusra utal. A mutánsban túlműködő gének KO-bejegyzései között pedig főleg aminosavak metabolizmusával kapcsolatos kifejezések dúsulnak, de megjelenik a „riboszóma”, valamint a nukleotid- és glutationmetabolizmusra utaló kifejezések is. A KEGG cci01100 és cci1110 térképeihez rendelt azonosítók alapján Fisher-féle egzakt próbával leteszteltem, hogy a DEG-ek között dúsulnak-e a metabolikus gének. A kontingenciatáblákat a 3. táblázat mutatja. A teszt alapján mind a négy DEG-csoportban (sötétben és fényen alulszabályozott, illetve túlműködő)

szignifikáns dúsulás jelentkezik. A KEGG-adatbázis segítségével vizualizáltuk a dúsuló útvonalakat (10.G ábra).

3. táblázat. Kontingencitáblák a metabolikus dúsulás ellenőrzésére a DEG-ek között. Rövidítések: n – adott csoportba nem tartozó gének (tehát komplementer génhalmaz); MET – metabolikus gének; D – sötétben nevelt, L – váltakozó fényen nevelt, dwn – alulszabályozott gének, up – felül szabályozott gének.

	MET	nMET		MET	nMET		MET	nMET		MET	nMET
Ddwn	70	123	Dup	154	305	Ldwn	97	184	Lup	114	285
nDdwn	1030	3704	nDup	946	3522	nLdwn	1003	3643	nLup	986	3542
p=0			p=0			p=0			p=0,0026		

A *C. cinerea* proteomja mind GO-, mind a KO-azonosítókkal gyengén annotált, így nem is vártuk ezektől az analízisektől, hogy teljesen megértjük, hogy a *Cc.pum1* milyen folyamatokban vesz részt; azt vártuk, hogy a találatok irányítják majd a figyelmünket, hogy milyen gén családok, gén csoportok expresszióját vizsgáljuk meg manuálisan. A GO-analízis alapján részletesebben megvizsgáltuk a sejtfallal kapcsolatos géneket. A hidrofobinok olyan kisméretű, sejtfelszíni fehérjék, melyek képesek impregnálni a hifákat. A szubsztráthoz tapadó micéliumra, a légmicéliumra és a termőtestre eltérő hidrofobin repertoár jellemző (Nagy és mtsai., 2023). Eredményeink szerint a mutánsban a hidrofobin gének jelentősen alul szabályozódnak (10.C ábra). A 35 gén közül csak egy mutatott magasabb expressziót a mutánsban (CopciAB_361161), és egy további nem szabályozódik alul jelentősen (CopciAB_409790) egyik kondícióban sem. A többi hidrofobin legalább az egyik kondícióban jelentősen alacsonyabb expresszióval rendelkezik a mutánsban a vad típushoz képest (három gén esetén legalább százszoros a különbség). A kitinmetabolizmusban részt vevő gének kifejeződésében nem látszik egyértelmű trend, a glükánmetabolizmushoz kötődő gének hőterképén viszont látszik egy alul szabályozódásra utaló széles jel (10.D ábra). A *C. cinerea* sejtfalában β -1,6-, illetve β -1,3-glükán is található. Vizsgálataink szerint a β -1,6-glükán bioszintézisében részt vevő gének kifejeződése érintett a mutánsban. A gombák tartaléktápanyaga a glikogén. Korábbi publikáció alapján (Nagy és mtsai., 2023) kigyűjtöttük a glikogénmetabolizmusban részt vevő géneket. A glikogénolízis enzimeinek expressziója jelentősen alacsonyabb a mutánsban, mint a vad típusban (10.E ábra) (pl. a három glükóamilázból kettő, az öt CBM21-ből három alul szabályozódik), ami a rossz tápanyag-mobilizációra utalhat. A glikogénszintézisben nem láttunk ilyen trendet. Sem a PCWDE (növényi sejtfal-bontó enzim) gének, sem pedig az autofágiában részt vevő gének expressziójában nem láttunk jelentős különbséget a vad típushoz képest, amiből arra

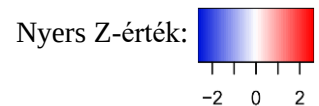
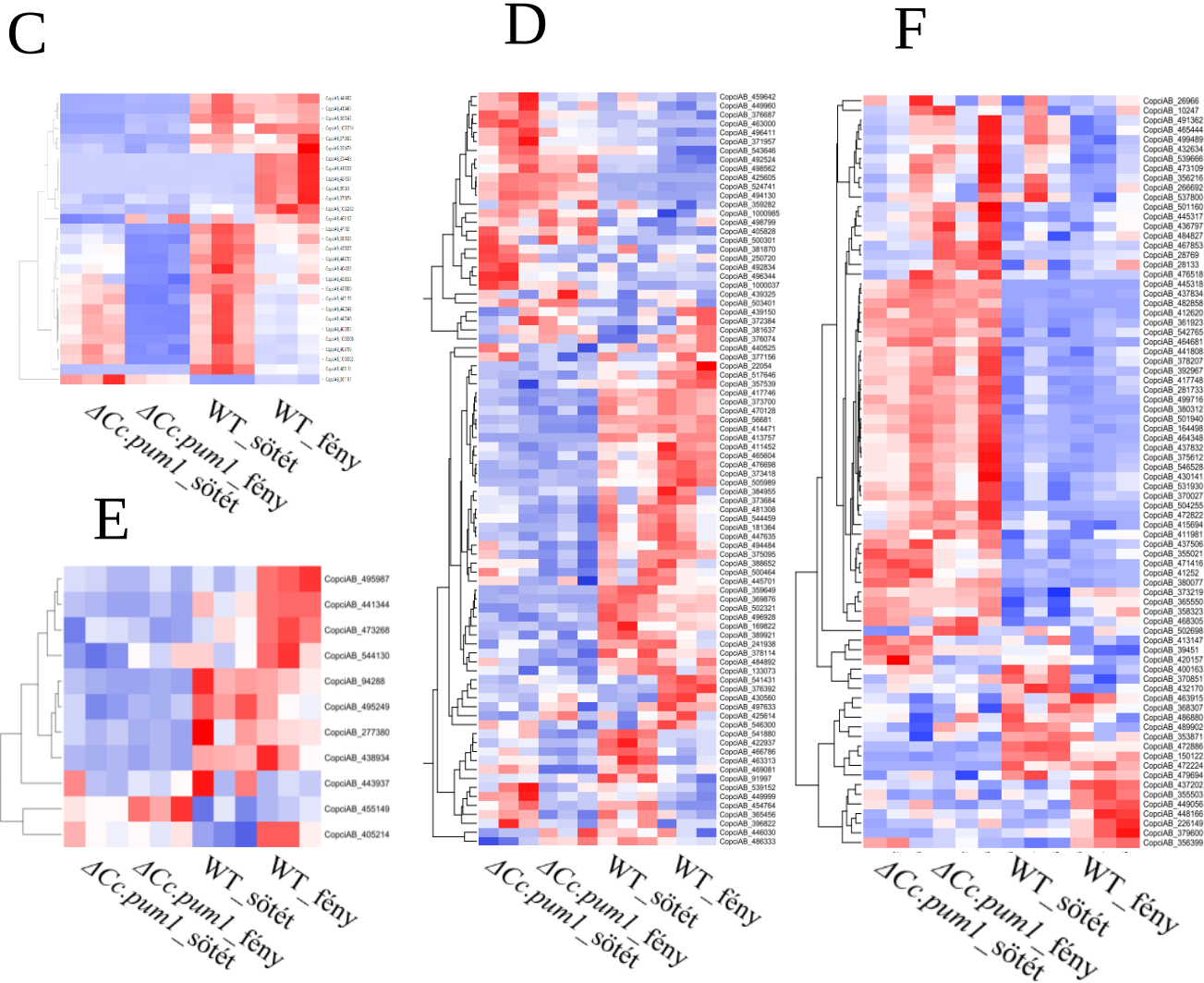
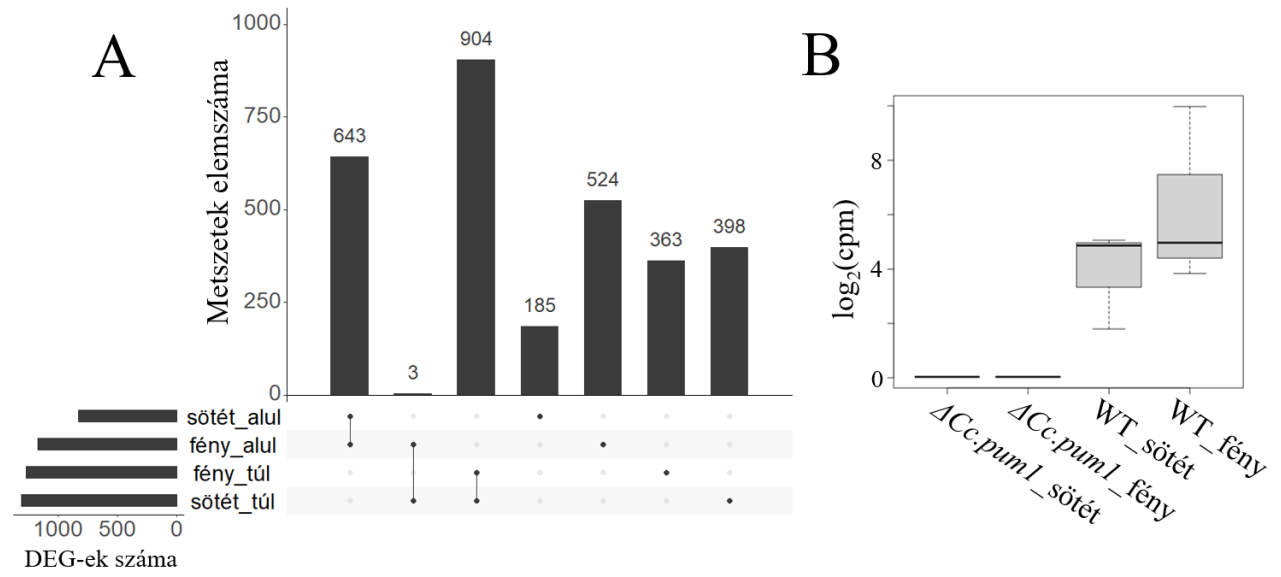
következtethetünk, hogy a mutáns nem éhezik a feltételezhetően rossz tápanyagmobilizáció ellenére sem. (A tenyésztési időt úgy választottuk meg, hogy a vad típusú kontrollban a tápanyagfogyás még ne legyen olyan mértékű, hogy beálljon az éhezés állapota.)

Manuális ellenőrzéssel megállapítottuk, hogy riboszomálisfehérje-gének (melyek jellemzően együtt szabályozódnak), túlműködnek a mutánsban. Ez összhangban van azzal, hogy a KEGG-analízisben is megjelenik a „riboszóma” kifejezés, és hogy mind a GO-, mind a KEGG-analízis alapján a mutánsban az aminosavak szintézise intenzívebb. A transzkriptom alapján az antioxidáns rendszer génjei is túlműködnek a mutánsban (10.F ábra).

A hidrofobinok elégtelen kifejeződése és a rossz tápanyag-mobilizáció összefüggésbe hozható a deléciós mutáns egészségtelen megjelenésével. Elképzelhető, hogy a mutáns vegetatív micéliuma nem tud kellőképpen felkészülni a termőtestképzésre. Meglepő az anyagcsere jelentős érintettsége. Ugyanakkor a *Cr. neoformans PUM1* génjéről is ismert, hogy pleiotróp regulátor, így nem kizárható, hogy a *Cc.pum1*-nek is szerteágazó funkciói vannak.

A micéliális fenotípus miatt további párhuzam merült fel a *PUM1*-ortológok szerepét illetően a *Cr. neoformans* és a *C. cinerea* fejlődésében. A *Cr. neoformans*ban az életmenet plazmogámiát megelőző élesztőfázisában a *Pum1* autorepresszív, a plazmogámiát követő dikarion fázisban nem autorepresszív, mely tulajdonsága alternatív transzkripciókezddéssel szabályozódik (Kaur, 2016). A *C. cinerea* a plazmogámia előtt monokarion formájában létezik. Azt a kérdést tettük fel, hogy lehet-e szerepe a *Cc.pum1*-nek a *C. cinerea* összeolvadó monokarionjainak robusztusabb dikarionná történő (metabolikus) átprogramozásában. Biztató, hogy a Jason E. Stajich és mtsai 2010-es publikációjához mellékelt adatsorában található gének (DEG-ek mono- és dikarionok összehasonlításában, mikrochip technológiával meghatározva) előkísérleteink szerint nagy dúsulást (30-70%) mutatnak a $\Delta Cc.pum1$ – vad típus DEG-ek között. Ahhoz, hogy erről tisztább képet kapjunk, komparatív transzkriptomanalízist tervezünk mono- és dikarionikus törzsek között, melyből egy *Cr. neoformans*éhoz hasonló transzkripció szabályozásra is fény derülhet.

Hosszabbtávú terveink közé tartozik a két RNS-kötő fehérje közvetlen interakciós partnereinek meghatározása FLAG-tagelés és fehérjetisztítás után, valamint a bazídium – termőtest homológia egysejt-transzkriptomikával való további tesztelése.



G



10. ábra. (A) UpSet-ábra a négy DEG-lista átfedéseinek szemléltetésére. DEG-listák elnevezésének értelmezése: pl. fény_alul: a váltakozó fényen nevelt mutánsban a váltakozó fényen nevelt WT-hoz képest alulszabályozódó gének. Az ábra táblázatos része jelöli ki a DEG-listák metszeteit. **(B)** A hifacsomó markernek tekinthető *Cc.cgl2* expressziójának összehasonlítása. **(C-F)** Különböző géncsoportok expresszióját szemléltető hő térképek. A genotípus (*ΔCc.pum1*, WT) és a kezelés (fény, sötét) által meghatározott csoportokban lévő három replikát külön ábrázoltam. A hő térképeket a heatmapper.ca online szoftver segítségével készítettük el; a klaszterezés a Pearson-korrelációk alapján történt. A színezés az adott génre vonatkozó 12 expressziós érték szélsőértékeihez igazodik. A jobb alsó sarokban lévő színskála mind a négy térképre vonatkozik. **(C)** Hidrofobingének expressziója. **(D)** A glükánmetabolizmus génjeinek expressziója. **(E)** A glikogenolízis enzimeinek expressziója. **(F)** Az antioxidáns rendszer elemeinek expressziója. **(G)** A *ΔCc.pum1*-ben alulszabályozódó (baloldalt, pirossal) és az abban túlműködő (jobbaldalt, pirossal) gének feltérképezve a cci01100 globális KEGG-anyagcseretérképre.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, dr. Nagy Lászlónak és dr. Csernetics Árpádnak a rengeteg segítségért és a hasznos tanácsokért. Hálás vagyok a Lendület Gomba Genomika és Evolúció Csoport minden tagjának, különösen dr. Bálint Balázsnak és dr. Hegedüs Botondnak az adatfeldolgozásban nyújtott segítségükért, valamint dr. Virágh Máténak, dr. Földi Csengének és dr. Liu Xiao-Binnak, akiktől sok laboratóriumi protokollt elsajátíthattam. Köszönetemet fejezem ki dr. Kocsubé Sándornak, aki belső konzulensként támogatta munkámat. Hálával tartozom a Nemzeti Tudósképző Akadémiának, mely immár ötödik éve támogatja kutatásaimat.

A jelen közlemény alapjául szolgáló kutatást a Nemzeti Orvosbiológiai Alapítvány Nemzeti Tudósképző Akadémia Programja támogatta a Kulturális és Innovációs Minisztérium pénzügyi hozzájárulásával.

A Kulturális és Innovációs Minisztérium Egyetemi Kutatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



7. Irodalomjegyzék

- Bingham, E. P., & Ratcliff, W. C. (2024). A nonadaptive explanation for macroevolutionary patterns in the evolution of complex multicellularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.2319840121>
- Cabrera-Ponce, J. L., León-Ramírez, C. G., Verver-Vargas, A., Palma-Tirado, L., & Ruiz-Herrera, J. (2012). Metamorphosis of the Basidiomycota *Ustilago maydis*: Transformation of yeast-like cells into basidiocarps. In *Fungal Genetics and Biology* (Köt. 49, Szám 10, o. 765–771). <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.07.005>
- Canam, T., Dumonceaux, T. J., Record, E., & Li, Y. (2013). White-rot fungi: The key to sustainable biofuel production? In *Biofuels* (Köt. 4, Szám 3, o. 247–250). <https://doi.org/10.4155/bfs.13.6>
- Casselton, L. A., Asante-Owusu, R. N., Banham, A. H., Kingsnorth, C. S., Kiies, U., Oyshea, S. F., & Pardo, E. H. (é. n.). *Mating type control of sexual development in Coprinus cinereus 1*. www.nrcresearchpress.com

- Castillo, D. I., Queller, D. C., & Strassmann, J. E. (2011). Cell condition, competition, and chimerism in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Ethology Ecology and Evolution*, 23(3), 262–273. <https://doi.org/10.1080/03949370.2011.568526>
- Clémenton, H., 20043078524, English, Bulletin, Germany, 0067-8066, 199, Stuttgart, Bibliotheca Mycologica, Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Cytology and plectology of the Hymenomycetes., (2004)
- Conte, G. L., Arnegard, M. E., Peichel, C. L., & Schluter, D. (2012). The probability of genetic parallelism and convergence in natural populations. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (Köt. 279, Szám 1749, o. 5039–5047). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2146>
- de Mattos-Shipley, K. M. J., Ford, K. L., Alberti, F., Banks, A. M., Bailey, A. M., & Foster, G. D. (2016). The good, the bad and the tasty: The many roles of mushrooms. *Studies in Mycology*, 85, 125–157. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.002>
- Hall, B. K. (2007). Homoplasy and homology: Dichotomy or continuum? *Journal of Human Evolution*, 52(5), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2006.11.010>
- He, M. Q., Zhao, R. L., Hyde, K. D., Begerow, D., Kemler, M., Yurkov, A., McKenzie, E. H. C., Raspé, O., Kakishima, M., Sánchez-Ramírez, S., Vellinga, E. C., Halling, R., Papp, V., Zmitrovich, I. V., Buyck, B., Ertz, D., Wijayawardene, N. N., Cui, B. K., Schoutteten, N., ... Kirk, P. M. (2019). Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 99(1), 105–367. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00435-4>
- Hibbett, D. S. (2007). After the gold rush, or before the flood? Evolutionary morphology of mushroom-forming fungi (Agaricomycetes) in the early 21st century. *Mycological Research*, 111(9), 1001–1018. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.01.012>
- Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., Abeywickrama, P. D., Aluthmuhandiram, J. V. S., Brahamanage, R. S., Brooks, S., Chaiyasen, A., Chethana, K. W. T., Chomnunti, P., Chepkirui, C., Chuankid, B., de Silva, N. I., Doilom, M., Faulds, C., Gentekaki, E., ... Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. In *Fungal Diversity* (Köt. 97, Szám 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>
- Jones, M., Gandia, A., John, S., & Bismarck, A. (2021). Leather-like material biofabrication using fungi. In *Nature Sustainability* (Köt. 4, Szám 1, o. 9–16). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00606-1>
- Kalač, P., Svoboda, L. (2000.). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry* 69. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00264-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00264-2)
- Kaur, J. N., & Panepinto, J. C. (2016). Morphotype-specific effector functions of *Cryptococcus neoformans* PUM1. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep23638>
- Kiss, E., Hegedüs, B., Virágh, M., Varga, T., Merényi, Z., Kószó, T., Bálint, B., Prasanna, A. N., Krizsán, K., Kocsubé, S., Riquelme, M., Takeshita, N., & Nagy, L. G. (2019). Comparative genomics reveals the origin of fungal hyphae and multicellularity. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12085-w>
- Knoll, A. H. (2011). The multiple origins of complex multicellularity. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 39, 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.031208.100209>
- Kües, U. (2000). Life History and Developmental Processes in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Köt. 64, Szám 2). <https://journals.asm.org/journal/membr>

- Kües, U., & Navarro-González, M. (2015). How do Agaricomycetes shape their fruiting bodies? 1. Morphological aspects of development. In *Fungal Biology Reviews* (Köt. 29, Szám 2, o. 63–97). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.05.001>
- León-Ramírez, C. G., Cabrera-Ponce, J. L., Martínez-Soto, D., Sánchez-Arreguin, A., Aréchiga-Carvajal, E. T., & Ruiz-Herrera, J. (2017). Transcriptomic analysis of basidiocarp development in *Ustilago maydis* (DC) Cda. *Fungal Genetics and Biology*, 101, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.02.007>
- Lin, X., & Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. In *Annual Review of Microbiology* (Köt. 60, o. 69–105). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>
- Liu, L., He, G.-J., Chen, L., Zheng, J., Chen, Y., Shen, L., Tian, X., Li, E., Yang, E., Liao, G., & Wang, L. (2018). Genetic basis for coordination of meiosis and sexual structure maturation in *Cryptococcus neoformans*. *eLife* <https://doi.org/10.7554/eLife.38683.001>
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
- Lugones, L. G., Wösten, A. B., Birkenkamp, K. U. Wessels, J. G. H. (1999.) Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 103(5). <https://doi.org/10.1017/S0953756298007552>
- Lynch, M. (2007). The frailty of adaptive hypotheses for the origins of organismal complexity. *PNAS* (104). <https://doi.org/10.1073/pnas.0702207104>
- Magyar Mikológiai Társaság, Jancsó, Gábor (1991.) *Mikológiai közlemények*.
- Merényi, Z., Prasanna, A. N., Wang, Z., Kovács, K., Hegedüs, B., Bálint, B., Papp, B., Townsend, J. P., & Nagy, L. G. (2020). Unmatched level of molecular convergence among deeply divergent complex multicellular fungi. *Molecular Biology and Evolution*, 37(8), 2228–2240. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAA077>
- Merényi, Z., Virágh, M., Gluck-Thaler, E., Slot, J. C., Kiss, B., Varga, T., Geösel, A., Hegedüs, B., Bálint, B., & Nagy, L. G. (2022). Gene age shapes the transcriptional landscape of sexual morphogenesis in mushroomforming fungi (Agaricomycetes). *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.71348>
- Moser, F., Trautz, M., Beger, A.-L., Löwer, M., Jacobs, G., Hillringhaus, F., Wormit, A., Usadel, B., & Reimer, J. (2017). *Interfaces: architecture.engineering.science*" 25-28th.
- Nagy, L. G., Kovács, G. M., & Krizsán, K. (2018). Complex multicellularity in fungi: evolutionary convergence, single origin, or both? *Biological Reviews*, 93(4), 1778–1794. <https://doi.org/10.1111/brv.12418>
- Nagy, L. G., Ohm, R. A., Kovács, G. M., Floudas, D., Riley, R., Gácsér, A., Sipiczki, M., Davis, J. M., Doty, S. L., De Hoog, G. S., Lang, B. F., Spatafora, J. W., Martin, F. M., Grigoriev, I. V., & Hibbett, D. S. (2014). Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5471>
- Nagy, L. G., Varga, T., Csernetics, Á., & Virágh, M. (2020). Fungi took a unique evolutionary route to multicellularity: Seven key challenges for fungal multicellular life. In *Fungal Biology Reviews* (Köt. 34, Szám 4, o. 151–169). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.07.002>
- Nagy, L. G., Vonk, P. J., Künzler, M., Földi, C., Virágh, M., Ohm, R. A., Hennicke, F., Bálint, B., Csernetics, Á., Hegedüs, B., Hou, Z., Liu, X. B., Nan, S., Pareek, M., Sahu, N., Szathmári, B., Varga, T., Wu, H., Yang, X., & Merényi, Z. (2023). Lessons on fruiting body morphogenesis from genomes and transcriptomes of Agaricomycetes. *Studies in Mycology*. <https://doi.org/10.3114/sim.2022.104.01>

- Navarro-González, M., Arndt, M., Zomorodi, M., Majcherczyk, A., & Kües, U. (2011). Regulation of fruiting body formation in *Coprinopsis cinerea*. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*
- Nguyen, T. A., Cissé, O. H., Yun Wong, J., Zheng, P., Hewitt, D., Nowrousian, M., Stajich, J. E., & Jedd, G. (2017). Innovation and constraint leading to complex multicellularity in the Ascomycota. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14444>
- Niego, A. G., Rapior, S., Thongklang, N., Raspé, O., Jaidee, W., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2021). Macrofungi as a nutraceutical source: promising bioactive compounds and market value. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050397>
- Sánchez-García, M., Ryberg, M., Kalsoom Khan, F., Varga D., T., Nagy D., L. G., & Hibbett, D. S. (2020). Fruiting body form, not nutritional mode, is the major driver of diversification in mushroom-forming fungi. *PNAS* 117(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.1922539117/-DCSupplemental>
- Shubin, N., Tabin, C., & Carroll, S. (2009). Deep homology and the origins of evolutionary novelty. In *Nature* (Köt. 457, Szám 7231, o. 818–823). <https://doi.org/10.1038/nature07891>
- Stajich, J. E., Wilke, S. K., Ahrén, D., Au, C. H., Birren, B. W., Borodovsky, M., Burns, C., Canbäck, B., Casselton, L. A., Cheng, C. K., Deng, ... Pukkila, P. J. (2010). Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11889–11894. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003391107>
- Szathmáry, E., Smith, J. M. (1995.) The major evolutionary transitions. *Nature*, 374. <https://doi.org/10.1038/374227a0>
- Szathmáry, E. (2015). Toward major evolutionary transitions theory 2.0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), 10104–10111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421398112>
- Szathmáry, E. (2024). Nonadaptive onset of complex multicellularity. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Köt. 121, Szám 11). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.2401220121>
- van Werven, F. J., & Amon, A. (2011). Regulation of entry into gametogenesis. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Köt. 366, Szám 1584, o. 3521–3531). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0081>
- Varga, T., Krizsán, K., Földi, C., Dima, B., Sánchez-García, M., Sánchez-Ramírez, S., Szöllősi, G. J., Szarkándi, J. G., Papp, V., Albert, L., ... Nagy, L. G. (2019). Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nature Ecology and Evolution*, 3(4), 668–678. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0834-1>
- Virágh, M., Merényi, Z., Csernetics, Á., Földi, C., Sahu, N., Liu, X.-B., Hibbett, D. S., & Nagy, L. G. (2021). *Evolutionary Morphogenesis of Sexual Fruiting Bodies in Basidiomycota: Toward a New Evo-Devo Synthesis*. <https://doi.org/10.1128/MMBR>
- Wang, L., Tian, X., Gyawali, R., Upadhyay, S., Foyle, D., Wang, G., Cai, J. J., & Lin, X. (2014). Morphotype Transition and Sexual Reproduction Are Genetically Associated in a Ubiquitous Environmental Pathogen. *PLoS Pathogens*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004185>
- Yamashita, A. (2019). meiRNA, A polyvalent player in fission yeast meiosis. In *Non-coding RNA* (Köt. 5, Szám 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ncrna5030045>
- Yoon, S. Y., Park, S. J., & Park, Y. J. (2018). The anticancer properties of cordycepin and their underlying mechanisms. In *International Journal of Molecular Sciences* (Köt. 19, Szám 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19103027>

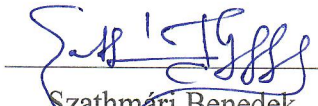
**A 37. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Szathmári Benedek nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott Termőtestképzésben potenciálisan szerepet játszó, RNS-kötő fehérjét kódoló gének funkcionális jellemzése *Coprinopsis cinerea* modellszervezetben című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

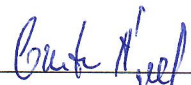
Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
Koncepció kidolgozása	3
Kísérletek megtervezése	4
Táptalajok összemérése, öntése; törzsek fenntartása, átoltása	5
Primerek, plazmidok, gRNS-ek tervezése	4
A plazmidok összeszerelése hatból öt esetében	5
Protoplasztálás, transzformáció, transzformánsok ellenőrzése (PCR, RT-qPCR)	5
DNS-extrakció (szekvenáláshoz)	5
Genomanalízis	5
Mutánsok fenotipizálása	5
RNS-extrakció (szekvenáláshoz)	5
RNS-szekvenciaadatok feldolgozása	2
GO-, KEGG-analízis	4
Géncsaládok expressziójának manuális annotációja	4
Ábrák készítése	5

Kelt: Szeged, 2024. november 8.


Szathmári Benedek
Pályamunkát benyújtó hallgató aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:


dr. Nagy László
Témavezető aláírása


dr. Csernetics Árpád
Témavezető aláírása