

36. OTDK Biológia szekció

A rotifer specifikus biopolimerek képzésének anatómiai háttere és biokémiai jellemzése

Készítette:

Sipos András

Molekuláris-, immun-, és mikrobiológia szakirány

MSc. II. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Genetikai Tanszék

Témavezetők:

Dr. Datki Zsolt László

Dr. Sinka Rita

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	2
1. BEVEZETÉS	3
1.1 Rotiferek.....	3
1.1.1 A Rotiferek általános jellemzése.....	3
1.2 Alkalmazott rotifer modellek.....	5
1.1.2.1 <i>Euchlanis dilatata</i>	5
1.1.2.2 <i>Lecane Bulla</i>	5
1.1.2.3 Bdelloid osztály jellemzése	6
1.2. Biopolimerek	7
1.2.1 A biopolimerek általános jellemzése.....	7
1.2.2 Rotimer	8
2. CÉLKITŰZÉS	11
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	12
3.1 Vizsgálatokban szereplő mikrometazoák.....	12
3.2 Anyagok	12
3.3 Alkalmazott módszerek.....	13
3.3.1 Rotiferek anatómiai vizualizálása	13
3.3.1.1 Rotifer izolálás.....	13
3.3.1.2 Rotifer festés.....	13
3.3.1.2.1 Rotifer organellumainak festése	13
3.3.2 A Rotimer biokémiai vizsgálata SDS-Poliakrilamid gélelektroforézissel	14
3.3.3 A Rotimer enzimekkel szembeni szenzitivitásának vizsgálata.....	15
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	16
4.1 A Rotiferek anatómiai vizualizálásának eredményei.....	16
4.1.1 A Rotifer organellumok és belső elhelyezkedésük detektálása	16
4.2 SDS-Poliakrilamid gélelektroforézis eredményei.....	21
4.3 A Rotimer enzimszenzitivitásának vizsgálatai	22
5. ÖSSZEFOGLALÁS	24
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	25
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	26
8. FÜGGELÉK	31
9. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	33

Rövidítésjegyzék:

RIK: Rotimer-Induktor Konglomerátum

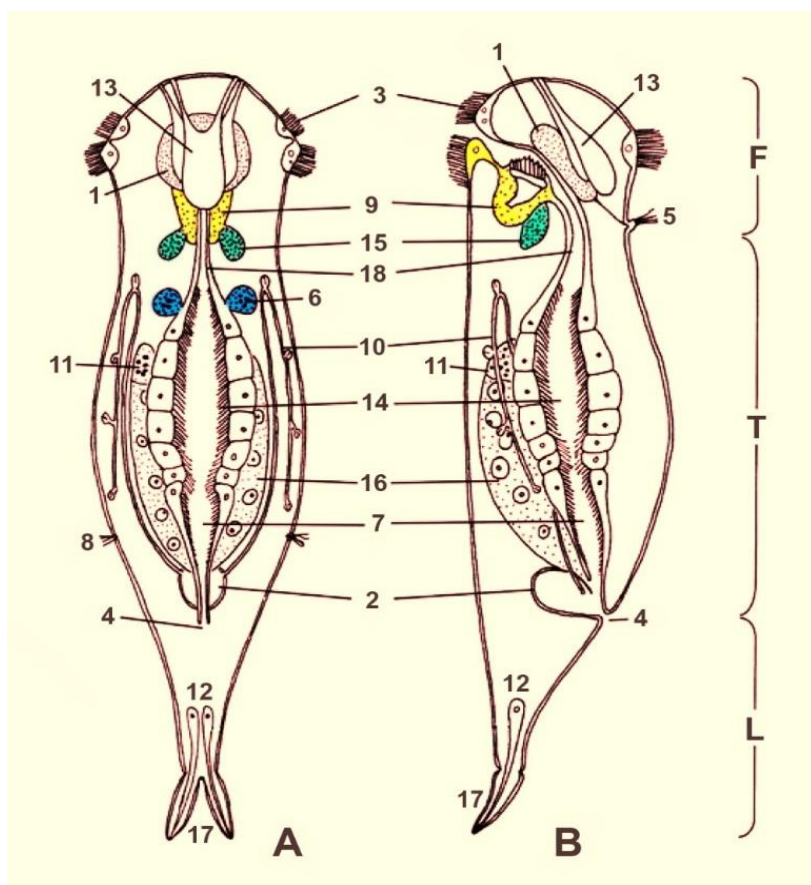
BTK: Biopolimer-termelő képesség

1. Bevezetés

1.1 Rotiferek

1.1.1 A Rotiferek általános jellemzése

A rotiferek (kerekesférgek) kozmopolita, mikroszkopikus soksejtű és egyben a világ legkisebb állatai, amelyek sós és édesvizekben, talajban, illetve sarkvidéki és magashegyi jégtakarókban egyaránt előfordulnak (Ejssmont-Karabin és mtsai., 2019). Testük körülbelül 1000 sejtől áll, összetett szervrendszerük a szaporítószerveket, az emésztőszervrendszert, az idegrendszert (40 db idegsejt) és a kiválasztó mirigyeket foglalja magában (1. ábra). Méretük átlagosan 200-300 µm, ritkán haladja meg a 0,5 mm-t.



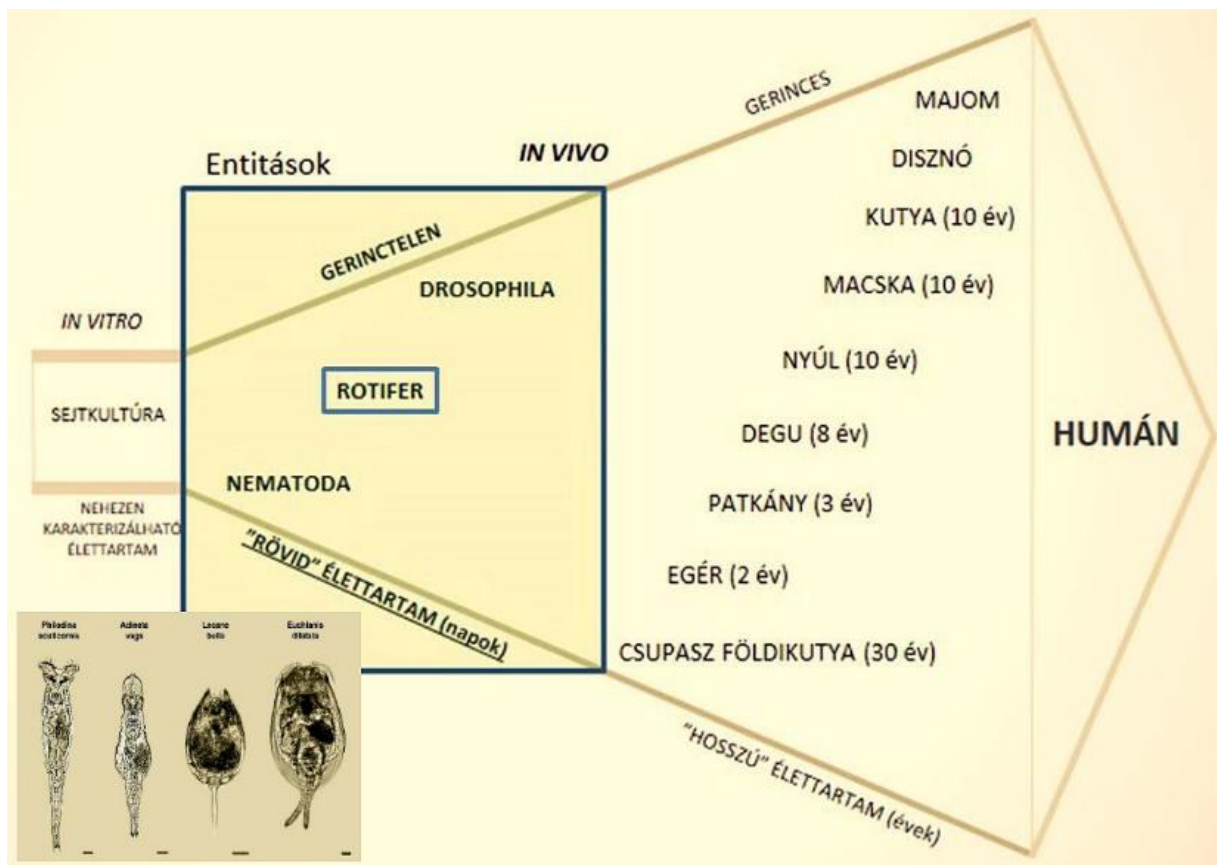
1. ábra: Rotifer általános anatómiai képe dorzális (A) és laterális (B) oldalról. Irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a Rotiferek a különböző színekkel jelölt felső régióban lévő, szekrécióra alkalmas területeket használják váladékok és testnedvek termelésére (6, 9, 15).

Rövidítések: F: fej, T: törzs, L: láb, 1: agy, 2: húgyhólyag, 3: korona, 4: kloákális nyílás, 5: dorzális csillók, 6: emésztő mirigy, 7: bél, 8: laterális csillók, 9: mastax, 10: protonefrídium, 11: ovárium, 12: lábmirigy, 13: retrocerebrális szerv, 14: gyomor, 15: nyálmirigy, 16: vitellárium, 17: faroknyúlvány, 18: nyelőcső (Fontaneto és Willem, 2015).

A feji részen elhelyezkedő

mozgató csillók segítségével képesek táplálkozni és úszni. Testük általában hosszúkas törzsszel és elhegyesedő végű lábbal rendelkezik. A törzs egy félkemény burkolattal, a lorikával védett, amelyet az epidermális sejteken belüli intracelluláris erősítő elemek alkotnak. Az izmos rágószerv (mastax) belső állkapcsokkal (trophi) van ellátva. Ezen kisméretű állatokon nincsenek különálló izomrétegek a testfalban, ugyanis egyetlen összefüggő izomcsoport található (Martini, 1912; Nachtwey, 1925; Peters, 1931; Stoßberg, 1932; Dehl, 1934). A törzsük képviselői széles körben elfogadott ökológiai indikátorok. Számtalan fajuk rutinszerűen alkalmazott kísérleti állatmodell a feltáró és rutin kutatások számos területén, mint például az

élettartam, az öregedés, az ürktatás, a neurotoxikus aggregátumok célzott katabolizmusa, az életképesség, a toxikológia, az evolúció és a horizontális géntranszfer, vagy a farmakológia és a gyógyszerkutatás (Ricci és mtsai., 2003; Dahms és mtsai., 2011; Snell és mtsai., 2014; Eyres és mtsai., 2015; González-Pérez és mtsai., 2016; Rico-Martínez és mtsai., 2016; Olah és mtsai., 2017; Datki és mtsai., 2018; Macsai és mtsai., 2019). Emellett az utóbbi időben egyre nagyobb jelentőséget kapnak a mikro-*in vivo* OMICS (genomika, transzkriptomika, proteomika, glikomika, metabolomika) módszertanokban (Hwang és mtsai., 2014; Nowell és mtsai., 2018) és a környezetbarát ipari technológiákban (pl. biopolimerek transzlációja, nyersanyag- és tápanyagforrás). Ezekre a mikrogerinctelenekre – más élőlényeknél is fókuszáltabban – jellemző az önfenntartással és a fajfenntartással kapcsolatos preferencia. Természetes élőhelyükön az általános tápanyaguk közé tartoznak a lebomló szerves anyagok (Fontaneto és mtsai., 2011; Robeson és mtsai., 2011).



2. ábra: A rotiferek helye az *in vivo* biológiai modellrendszerekben (Datki és mtsai., 2022)

Filogenetikusan szelektált képességüknek köszönhetően képesek a szerves hulladékban előforduló konglomerátumokat és aggregátumokat "táplálékként" felhasználni. Hatékonyan alkalmazkodnak a természetes környezeti változásokhoz (adaptív fenotipikus plaszticitás), sőt, kedvezőtlen körülmények között is képesek túlélni, például anyagcseréjük csökkentésével, az aktív élet vagy a petetermelés felfüggesztésével (Shain és mtsai., 2016; Jönsson és Wojcik,

2017; Kanazawa és mtsai., 2017). A bdelloidok, mint például a *Philodina acuticornis* vagy az *Adineta vaga*, bizonyos szélsőséges körülmények között képesek az emberi típusú neurotoxikus aggregátumokat, pl. a béta-amiloidot, alfa-szinukleint és scrapie-típusú priont katabolizálni (Datki és mtsai., 2018). Egyes gerinctelenek képesek különböző típusú biopolimerek kiválasztására is; ez elsősorban a *Mollusca*, *Echinodermata* és az *Arthropoda* törzsbe tartozó tengeri fajoknál figyelhető meg (Ganesana és mtsai., 2020).

1.1.1 Alkalmazott rotifer modellek

1.1.1.1 *Euchlanis dilatata*

Az *Euchlinidae* családot összefüggő lemezekből álló lorika jellemzi. Mozgásukat hosszúkás nyúlványpár segíti (Koste & Shiel, 1989). Számos *Euchlanis* faj társul a *Sphagnum* nemzetséghez, mint gyakori szubsztrátumhoz (Bledzki & Ellison, 2003; Jersabek és mtsai., 2003). Az *E. dilatata* édes és sós vizekben egyaránt előfordul, és a tápanyagban gazdag, különösen a cianobaktériumoknak kedvező vizet részesíti előnyben (Manuel Barrabin, 2000). Ezeknek a vizeknek a pH-tartománya általában 6,3-9,6, a hőmérsékleti tartomány pedig 6,4-24 °C között mozog (Ejsmont-Karabin és mtsai., 1993). Ez a bentikus-perifitikus faj a part menti zónákat szintén kedveli (Manuel Barrabin, 2000), de előfordulhat bryophytákon (Jersabek, 2016) és más makrofitákon is (Plewka, 2016). Az *E. dilatata* érzékeny bioindikátorként is szolgálhat (Sarma és mtsai., 2001) pollutánsok monitorozásához. Egy herbicidekkel végzett kísérletben metil-paration jelenlétében jelentős csökkenést figyeltek meg az állatok populációsűrűségében és a populáció növekedési ütemében. Ez a folyamat a metil-paration koncentrációjának növekedésével súlyosbodott, függetlenül a táplálék koncentrációjától. A magasabb táplálékkoncentráció azonban enyhítette a populáció növekedési ütemére gyakorolt negatív hatást (Glime, 2017). Az állat laboratóriumban képes túlélni a cianobaktériumokon, valamennyi *Sphagnummal* előforduló nemzetségen, de akár proklorofiton is (Gulati és mtsai., 1993). A természetben detrituszt, baktériumokat, cianobaktériumokat és a *Cyclotella* nevű diatómát fogyaszt (Carlin, 1943). Gyakran kihasználja a planktonikus algakolóniákhoz való kötődés előnyeit (Pejler, 1962) is, és fogyasztja is őket.

1.1.1.2 *Lecane bulla*

A *Lecane* nemzetség az édes és sós vizekben élő, közepes méretű rotifer, amely széles földrajzi övezeten elterjedt, de azon belül elsősorban endémikusan létezik, vagyis sok kozmopolita fajjal rendelkezik, de jelentős részük korlátozott elterjedésű (Segers, 1995; 1996). Valamennyi *Lecane* faj aljzatlakó, elsősorban a part menti élőhelyeket preferálják, de

előfordulnak úszó és víz alatti vegetációkban is (Koste & Shiel, 1990; Kuczynska-Kippen, 2007). A nemzetség egyik gyakori kozmopolita faja az *L. bulla*, amely a világ számos vízi környezetében megtalálható (Segers, 1995). Az állatra jellemző a tojásdad alakú lorika, valamint egy viszonylag hosszú nyúlvány, amely vagy hasadéokban és hosszú álkarmokban, vagy összenőtt álkarmokban végződik (Segers, 1995). A *L. bulla* hímje kisebb, mint a nőstény, és hosszúkás, féregalakú testtel, valamint két nyúlvánnyal rendelkező végtaggal rendelkezik (Segers & Rico-Martínez, 2000). A kis testméretük és a taxonómiai releváns morfológiai jellemzők szűkössége miatt nehéz a példányokat faji szinten azonosítani (Segers, 2007; Mills és mtsai., 2017). Viszont a DNS-alapú taxonómia fejlődése új megközelítést tett lehetővé a rotiferek diverzitásának vizsgálatában. Az ezen az elven alapuló technikák objektív eszközt biztosítanak a biodiverzitás értékelésére a molekuláris markerek variációjának elemzésével (Fontaneto és mtsai., 2015). Walsh és mtsai., (2009) a citokróm c oxidáz alegység 1 (COI) és belső átírt térköz (ITS) molekuláris markereket használva 3 kriptikus fajt azonosítottak az *L. bulla* 22 populációjában. García-Morales és Elías-Gutiérrez (2013) pedig 8 genetikailag eltérő klasztert identifikált kísérletükben, amelyhez 18 délkelet-mexikói *L. bulla* populációból gyűjtöttek egyedeket.

1.1.1.3 Bdelloid osztály jellemzése

A bdellodiok apró méretű, vízben élő metazoák, amelyek hosszú és puha/félkemény testtel rendelkeznek. A fej és farok végtagjain pszeudoszegmensek találhatóak, fejük pedig csillós koronával rendelkezik (Wallace és mtsai., 2006). Az osztályra jellemző, hogy egységes a testfelépítésük, beleértve a mastax alaktani jellegzetességeit és a csillós korona szerveződését is (Ricci és mtsai., 2001). A bdelloid rotiferák olyan ökológiai és evolúciós tulajdonságokkal rendelkező élőlények, amelyek rendkívül sikeres csoportot alkotnak már több mint 35-50 millió éve. Jellemzőik közé tartozik a szűznemzéses ivartalan szaporodás, a degenerált tetraploiditás és a horizontális génátvitel. Legszokatlanabb tulajdonságuk, hogy képesek lappangó (anabiotikus) anyagcsere állapotba lépni környezeti stressz hatására, mint például a kiszáradás. Ebben az állapotban képesek túlélni olyan abiotikus faktorokat, mint a sugárzás, nagy nyomás, vagy alacsony hőmérséklet. Ez a nyugalmi stádium az úgynevezett anhidrobiózis, melyet általában a víz elpárolgása vált ki (Crowe, 1971; Crowe és mtsai., 1992). A legtöbb bdelloid faj képes a beszáradásra (Ricci, 1998). Legújabb kutatások alapján a beszáradásból való felépülés során egyes fajokban DNS/genom javító mechanizmusok játszódnak le, amely számos más tulajdonságra is (pl. evolúciós szelekció) pozitív hatással lehet. Feltételezhetően ezek a folyamatok teszik lehetővé a bdelloidok számára, hogy ellenálljanak az ionizáló sugárzásokkal

szemben, felhagyjanak az ivaros szaporodásukkal és horizontális géntranszfert hajtsanak végre (Ricci & Fontanet., 2009). Egyes fajokról megállapították, hogy az anyagcseréjük és az aktivitásuk csökkentésével képesek túlélni a hosszan fennálló éhezést is, sőt még az élettartamuk is jelentősen megnő (Ricci & Perletti, 2006). Napjainkban a bdelloid rotiferek, mint a *Philodina acuticornis* és az *Adenita vaga* széles körben használt mikrogerinctelen modellekként szolgálnak különböző toxikológiai, öregedési és farmakológiai kutatásokban (Snell és mtsai., 2017, 2018; Datki és mtsai., 2019; Macsai és mtsai., 2019).

1.2 Biopolimerek

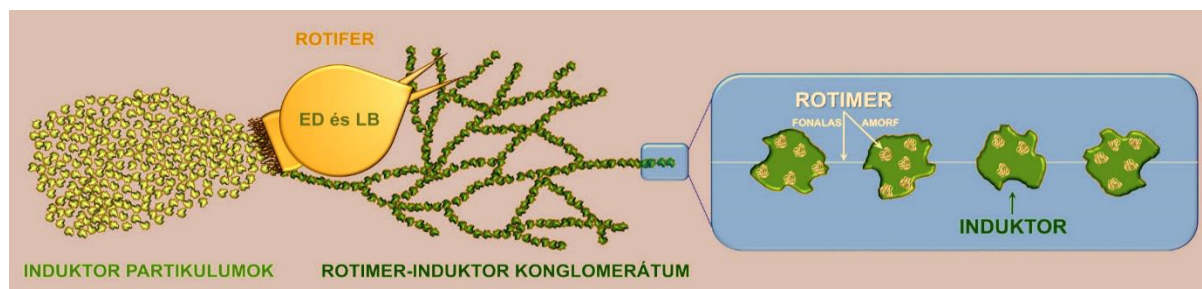
1.2.1 A biopolimerek általános jellemzése

A biopolimerek olyan kémiai anyagok, amelyek ismétlődő egységekből (monomerekből) állnak és magasabb rendű molekulaszerkezeteket képeznek. Kémiai tulajdonságaik alapján több típusát is megkülönböztethetjük. Ezek a polipeptidek, polinukleotidok, poliszacharidok, peptidoglikánok, proteoglikánok, glikoproteinek és e csoportok vegyes típusai (Chandra és Rustgi, 1998; Hassan és mtsai., 2019). Az enzimekkel szembeni szenzitivitásukat elsősorban az alapszerkezetük befolyásolja, pl. a polipeptidek lebonthatók proteázokkal, mint a proteináz K vagy a tripszin (Muhlia-Almazán és mtsai., 2008). A biopolimerek szerkezeti kialakulásához mindig szükség van térhálósító anyagokra, pl. fémionokra, mint a kalcium ion (Silva és mtsai., 2009). Ezeket a biomolekulákat (pl. cellulóz, kitin, pókselyem, kazein, kollagén, albumin, kitozán) részletesen vizsgálták, és széles körben alkalmazzák őket (Niaounakis, 2015). A változatos természetes élőhelyek (pl. óceánok, tengerek, tavak, folyók, vizes élőhelyek, tócsák, patakok, csatornák és termálforrások) hatására a vízi szervezetek a polimerek különböző változatait fejlesztették ki. Az egyes változatok energiakonzerváló, szerkezeti és anyagcserével kapcsolatos, valamint sejtmegújulással és víztaszítással kapcsolatos funkciókat töltenek be. Ezek az összetett biomolekulák megtalálhatók endogén módon is, pl. az extracelluláris térben, a sejtfalban, a szövetekben, az exoskeleton epidermiszében, illetve exogén formában váladékként vizes közegben és szárazföldön egyaránt. A környezet különböző faktora, mint például a sótartalom, a mélység (nyomás), a fényintenzitás, a hőmérséklet, a sűrűség (ozmolaritás), a pH, a zsákmány/ragadozók jelenléte, a tápanyagok, az oldott gázok, a víz áramlási sebessége, a növény- és állatvilág, hatással vannak a biopolimerek kiválasztására és képződésére (Olatunji, 2020). E természetes anyagok alapfunkciója az érintett állatok életmódjától és környezetétől függ. Például a helyben élő tengeri gerinctelenek (kagyló, csőféreg, tengeri csillag, tapadó

tengeri csiga, tengeri uborka) a különböző felületekhez való rögzüléshez termelnek adhezív bio-ragasztóanyagokat. A tapadási képesség a különböző fiziko-kémiai kötődési típusoktól függ, amelyek lehetnek állandóak, átmenetiek, ideiglenesek és pillanatnyiak (Hennebert és mtsai., 2018). Az egyik legkorábbi tapadó biopolimert Arisztotelész írta le, byssus néven, amelyet egy tengeri puhatestű, a *Pinna nobilis* állít elő. Európa déli részén és Észak-Afrikában ezt a szálas és mechanikai sokkelnyelő biopolimert finom, de nagyon rugalmas szerkezete miatt a textilgyártásban használták. A kémiai és szerkezeti formái között fajspecifikus különbségek vannak, de közös jellemzőik közé tartozik az öngyógyító, merev, biológiailag újrahasznosítható és DOPA-függő tapadó képesség. Összetételük túlnyomórészt fehérjét tartalmaz, kisebb mennyiségű lipidekkel és szénhidrátokkal. Ezeket az anyagokat átfogó rugalmasság, gyors regenerálódási képesség és nagy biomimetikai potenciál jellemzi. Mivel nem hasonlítanak más tipikus elasztomer fehérjékhez, újszerű eszközöket biztosítanak a gyógyászati-ipari fejlesztésekhez (Ehrlich, 2019; Olatunji, 2020). A biológiai kutatások területén munkánk egy általunk felfedezett biopolimer család egyik típusára koncentrálódik. A rotiferek egy eddig ismeretlen tulajdonságát feltárva, kezünkbe került egy speciális biopolimer, nevezetesen a Rotimer nevű exogén exudátum, mint potenciális molekuláris és információs tudásforrás (Datki és mtsai., 2021).

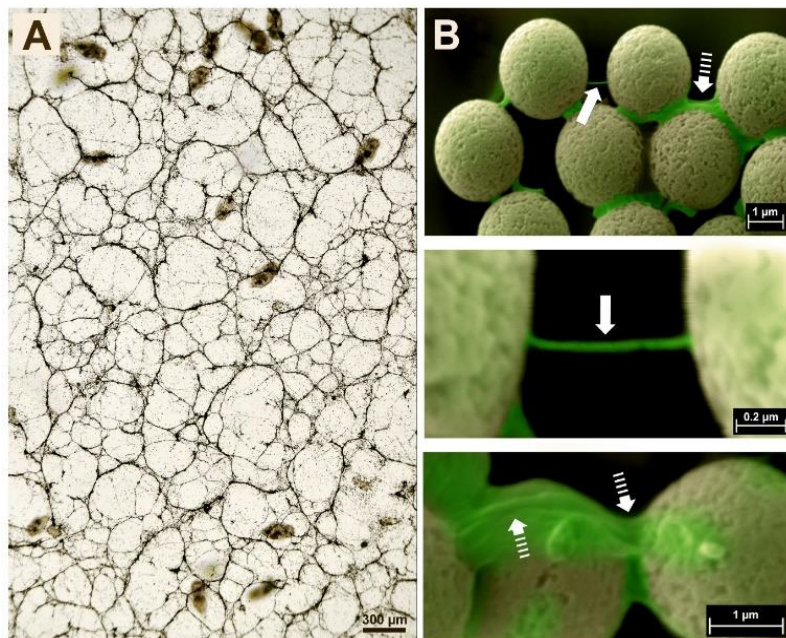
1.2.2 A Rotimer

A rotifer specifikus biopolimer, leközölt fantázievén „Rotimer”, amelyet többek között a monogonantok és bdelloidok is fajspecifikus sajátosságokkal képesek termelni, egy exogén jellegű viszkoelasztikus biopolimer, amely szálas, film vagy ragasztószerű formákkal rendelkezik (Datki és mtsai., 2021). A Rotimer család egy evolúciósan kialakult, filogenetikailag ősi, fehérje-szerű multifunkcionális molekula, amelynek képződése egységesen és szigorúan kalciumfüggő folyamat (Balazs és mtsai., 2021). Ennek az exudátumnak a termelését különböző mikrorészecskék (partikulumok) indukálják (3. ábra), ezáltal egy speciális hálózatos Rotimer-Induktor Konglomerátumot (RIK) képeznek.



3. ábra: A részecskék által indukált Rotimer-Induktor Konglomerátum képzése monogonant rotiferek által (Datki és mtsai., 2021).

Ezen biopolimer-induktor komplex létrejöttének indukálása csak a rotiferek csillóinak mechanikus irritációjával érhető el, különböző típusú (élesztő sejtvázas, denaturált BSA, epoxy, kármin vagy urea kristályok, vagy mikro-cellulóz) és méretű (kb. 3 és 50 μm átmérőjű) inert részecskék beadásával, mint tapadó iniciátorok. Az *E. dilatata* Rotimerjének vastagsága 33 ± 3 nm, pásztázó elektronmikroszkóppal detektálva (4. ábra).



4. ábra: Az *E. dilatata* által képezett (fém-epoxy gyöngyök által indukált) Rotimer-Induktor Konglomerátum (A) és annak pásztázó elektronmikroszkópos (B) bemutatása. A szálak formát nyilakkal, a ragasztószerű szerkezetet szaggatott nyilakkal ábrázoltuk (Datki és mtsai., 2021).

Az állatok életképességtől is függő RIK-termelő képesség jelentősen módosul az élettani deplációs (kimerülés), gyógyszer- (toxin vagy

stimulátor) és környezeti (hőmérséklet, sótartalom és pH) hatások következtében. Az állatok által termelt RIK számos kémiai hatásnak ellenáll, mint pl. savak, lúgok, kelátorok, vagy detergensok. A Rotimer komponense alacsony toxicitással társuló, a sejtek (alga, élesztő és humán neuroblastoma) mozgékonyágát gátló hatással bír. A biopolimer-szekrécións képesség védelmet nyújt a rotifereknek a humán típusú béta-amiloid aggregátumokkal szemben is. A Rotimert és a hozzá kapcsolódó molekuláris folyamatokat fiziko-kémiai tényezők (pl. hőmérséklet, pH vagy fémionok) befolyásolják. Datki és mtsai., (2022) kidolgoztak egy matematikai képletet egy korábban közzétett életképességi marker továbbfejlesztett változatoként, melynek célja volt a biopolimer-termelő képesség (BTK) és a termelt exudátum relatív mennyiségének jellemzése különböző körülmények között. A rotiferek részecskefüggső szaporodását (peterakás) és BTK-t érintő biológiai hatásokat (pl. protozoa jelenléte) figyelték meg. Nem planktonikus rotifer fajokat (*P. acuticornis*, *A. vaga*, *E. dilatata* és *L. bulla*) vizsgáltak párosított mikrometazoa, protozoa ko-kultúrákban *Paramecium*, *Diplonema* és *Amoeba* bevonásával. Ezek az egysejtűek (protozoa) hasznos táplálékforrások, szaporodásfokozó vagy akár toxikus tényezők is lehetnek a fent említett állatok számára, de részecske-szerű mechanikai stimulátorként is működhetnek. A jelenlegi vizsgálatok továbbá azt mutatják, hogy a bdelloidok a monogonantokhoz hasonlóan termelnek fonalas váladékot,

ráadásul a bdelloidok testét a váladékuk be is borítja, különösen az *A. vaga* esetében, ellentétben a monogonantokéval (*Datki és mtsai., 2021; 2022*). Ebben a RIK-képződésben a fent említett biopolimer fehérje jelleget sugall, pontos kémiai összetétele és szerkezete még ismeretlen. A tudományos szakirodalom alapján bizonyított, hogy számos faj képes a rotiferekhez hasonlóan biopolimereket szekretálni, azonban ennek az újszerű Rotimernek a szabályozása még nem ismert (*Balazs és mtsai., 2021*).

2. Célkitűzés

A rotiferek általánosságban, de ezen belül is a monogonant osztályba tartozó fajok közül (pl. *Euchlanis dilatata* és *Lecane bulla*) néhányan kiemelkedően képesek egy exogén típusú, fonalas és ragacs állagú exudátum, nevezetesen a rotifer specifikus biopolimer (Rotimer) termelésére. Ez egy fehérjeszerű multifunkcionális molekula, – csoportunk által elsőként leközölve – amelynek képződése egyöntetűen felületi töltés és ionikus kalcium függő folyamat. A Rotimer különböző önálló molekuláris sajátosságokkal rendelkezik, mint pl. az adhéziónak a jellege, vagy az antiszeptikus és filtrációs hatása. Ennek a viszkoelasztikus biomolekulának a termelését különböző, meghatározott méretű (3-50 μm között) mikrorészecskék (partikulumok) indukálják, amelyek következtében egy speciális Rotimer-Induktor Konglomerátum (RIK) képeződik hálózatos formában.

Az újonnan felfedezett, rotiferek által kiválasztott biopolimer szekréciós anatómiai háttere és biokémiai sajátossága még ismeretlen. Jelen – pilot jellegű – munkámban célul tűztük ki az *E. dilatata* faj belső szervrendszerének vizualizálását, valamint ez alapján a lehetséges szekréciós területek és anatómiai képletek beazonosítását. Kíváncsiak voltunk a Rotimer alapvető molekuláris jellegére (pl. milyen jellegű szerves anyag) és tulajdonságaira is, így két faj (*E. dilatata* és *L. bulla*) esetében is célzott és feltáró méréseket terveztünk.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Vizsgálatokban szereplő mikrometazoák

A kísérleteket monogonant rotifer fajokon (*E. dilatata* és *L. bulla*) végeztük, a hatályos nemzetközi előírásoknak megfelelően, minek értelmében nem volt szükség külön etikai engedélyre. Az állatokat (6 évvel ezelőtt) a szegedi (Dél-Alföld, Magyarország) Vértóból (GPS koordináták: 46° 16' 25" É; 20° 08' 39" K; kora nyár) nyertük. Minden tenyésztést és mérést állandó környezetben végeztünk (24 °C; pH = 7,5; 40-45%-os levegő páratartalom). Minden második napon hővel inaktivált és pasztörizált, homogenizált és szűrt (műanyaggháló; pórusátmérő: 10 µm) alga-élesztő (1:1 arányban) szuszpenzióval etettük őket.

3.2 Anyagok

A munkában alkalmazott anyagok a következők voltak: élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*; EU-standard granulált instant forma, kat. sz.: 2-01-420674/001-Z12180/HU); alga (*Chlorella vulgaris*; BioMenu, Caleido IT-Outsource Kft.; kat. sz.: 18255); desztillált víz (DW; Millipore Ultrapure; Merck), Formaldehid (CH₂O; kat. sz.: 252549, Merck), Triton X-100 (kat. sz.: 18255; ThermoFisher scientific), SlowFade™ Diamond Antifade Mountant (kat. sz.: S36963; Invitrogen), 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorid (DAPI; kat. sz.: D1306; ThermoFisher scientific), Falloidin (kat. sz.: A12379; Invitrogen), MitoTracker™ Red CMXRos (kat. sz.: M7512; Invitrogen), Acridin orange (kat. sz.: 62344; PubChem), Neutral red (kat. sz.: 11105; PubChem), LysoTracker™ Red DND-99 (kat. sz.: L7528; ThermoFisher scientific), Dimetil-szulfoxid (DMSO; kat.sz.: D8418; Sigma-Aldrich), Akrilamid, Nátrium-dodecil-szulfát (SDS; kat. sz.: 24680-1- 0833; Reanal), Page ruler™ prestained protein ladder (kat. sz.: 26616; Thermofisher scientific), Coomassie Brilliant Blue R-250; Etanol (EtOH; kat. sz.: 02911-481-430; Molar Chemicals Kft), Ecetsav (kat. sz.: 02790-101-340; Molar Chemicals Kft), Petri-csésze (kat. sz.: 430167; Corning), Sejtenyésztő flaska (kat. sz.: 430168; Corning), Univerzális műanyaggháló (pórusátmérő: 15, 50 és 350 µm), DynaMag-2 mágnes (kat. sz.: 12321D; Life Technologies), 24 lyukú lemez (kat. sz.: 3524; Corning-Costar), Dynabeads M-270 szuperparamágneses epoxy-fém gyöngyök (kat. sz.: 14301; Life Technologies), karbamid-kristályok (kat. sz.: 24578-1-01-38; Life Technologies AS), Tripszin (kat. sz.: (Pierce-)90057; Sigma-Aldrich), Kimotripszin (kat. sz.: (Pierce-)90056; Invitrogen; kat. sz.: SRP6509; Sigma-Aldrich), Papain (kat. sz.: P4762; Sigma-Aldrich), Proteináz-K (kat. sz.: P-6556; Sigma-Aldrich), Karboxipeptidáz A (kat. sz.: C-9268; Sigma-Aldrich; kat. sz.: 21938; Fluka), Karboxipeptidáz B (kat. sz.: 103233; Boehringer Mannheim), Kollagenáz (kat. sz.: C0130; Sigma-Aldrich), Proteináz S (kat. sz.: 33749; Serva), Alfa-amiláz és glükóamiláz (kat. sz.:

86250; Sigma-Aldrich), Béta-glükozidáz (kat. sz.: G8625; Sigma-Aldrich), Lizozim (kat. sz.: 12041; Reanal; kat. sz.: 837059; Boehringer Mannheim), Celluláz (kat. sz.: 16420; Serva), Kitaláz (kat. sz.: AWL-757; Wako), Zimoliáz (kat. sz.: 8111; Seikagaku Kogyo), Maceráz (kat. sz.: 441201; Calbiochem), Pektináz, Béta-glükuronidáz (kat. sz.: G0751; Sigma-Aldrich), Laminaráz (kat. sz.: L9259; Sigma-Aldrich), Pullulanáz (kat. sz.: P2138; Sigma-Aldrich), Novozim 234 (kat. sz.: 492004; Calbiochem; kat. sz.: PPM3424; Novo biolabs), Hemicelluláz (kat. sz.: H2125; Sigma-Aldrich), Lipáz (kat. sz.: L-0382; Sigma-Aldrich). Az alkalmazott standard médium (mg/L): Ca^{2+} 30; Mg^{2+} 15; Na^+ 3.2; K^+ 0.5; pH = 7,5; HCO_3^- 150; SO_4^- 2.5; Cl^- 1.4; NO_3^- 4.5; F^- 0.01; SiO_2 8; konduktibilitás (20 °C): 428 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

3.3 Alkalmazott módszerek

3.3.1 Rotiferek anatómiai vizualizálása

3.3.1.1 Rotifer izolálás

A tenyészetekből a rotiferek kinyerése mechanikus izolálással történt. A folyamat során szimultán kétféle pórusméretű plasztik hálót alkalmaztunk. Felső állásban egy 350 μm -es lyukátmérővel rendelkező típust, a tenyészetből származó törmelékek kiszűrésére, melynek teljes átmérője legalább 5 cm, valamint egy alsó állásban lévő 50 μm -es lyukátmérővel rendelkező típust az állatok felfogására, melynek teljes átmérője legalább 3 cm volt. A hálóval felfogott állatokat visszamosztuk vizsgálati tenyészmedényekbe, adekváttá téve őket a vizsgálatokra.

3.3.1.2 Rotifer festés

3.3.1.2.1 Rotifer organellumainak festése

A rotifer belső szerveinek részletgazdag feltárásához fluoreszcens festékeket használtunk. A fixáló, mosó és festő reagensek összetevői az 1. függelék 1. táblázatában találhatók. Izolálás után a rotifereket tartalmazó felfogó hálót átmostuk ioncserélt desztillált vízzel (DW) a kisebb méretű tenyésztési törmelékek eltávolítása érdekében. A begyűjtött élő állatok jelölését végkoncentrációban a következő festékekkel végeztük: 5 μM MitoTracker Red CMXRos (0,2% DMSO); 0,1 μM LysoTracker (0,1% DMSO); 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Neutral red; 20 μM Acridin orange. Az inkubálási idő 30 percet vett igénybe, LysoTracker esetében pedig 3 órát. A festékek kimosása DW-el 30 percig történt. Az állatok fixálása a DAPI, Falloidin és MitoTracker Red CMXRos esetében 4%-os formaldehiddel, a LysoTracker, Neutral red és Acridin orange esetében pedig 2%-os formaldehidet tartalmazó fixáló oldatban történt, 30

percen keresztül. A fixáló oldat kimosása érdekében a felfogó hálót (minden esetben rajta a jelölendő rotiferekkel) DW-be tettük, majd 2x20 percig állni hagytuk benne vízcserével, miközben 2-3 alkalommal enyhén megmozgattuk. A mosási lépéseket a LysoTracker, Neutral red és Acridin orange esetében DW-el végeztük 3 ismétléssel, vízcserével. A DAPI, Falloidin és MitoTracker Red CMXRos esetében a felfogó hálót 0,4%-os PBSTX (0,1% Tween20 + 0,3% Triton X-100) oldatba helyeztük, 30 percig. Ezt követően DW-ben mostuk 20 percig. Áthelyeztük 0,1%-os PBST (0,1 % Triton X-100) oldatba, 30 percig, míg 2-3 alkalommal enyhén megmozgattuk. A felfogó hálót DW-be helyeztük és 5 percig állni hagytuk. A rotifereket áthelyeztük 1,5 ml-es eppendorf csőből kialakított kis átmérőjű, kupakkal befogatott felfogó hálóra. A további festéshez 0,5 ml végtérfogatú DAPI (1:500) és Falloidin (1:400) festő oldatot használtunk, melyet a hálóval és az állatokkal rendelkező megfordított eppendorf csőbe nyomtunk, majd 30 percig inkubáltuk, minek leteltével 3xDW mosást kapott. Az állatokat tartalmazó szűrőt nagyon óvatosan kivettük a leszorító kupakból, majd ráfordítottuk egy preparált tárgylemezre és 10 µl Antifade Mounting Medium fénytelenítő reagenssel montíroztuk, majd fedőlemezrel lefedtük. A megfestett állatokat Olympus Fluoview Fv10i konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az excitáció/emisszió (nm) értékek a következők voltak: DAPI 359/461; Falloidin 499/520, Mitotracker Red CMXRos 578/598, LysoTracker 578/592, Acridin orange 443/620 piros és 480/527 zöld színben, Neutral red 537/619 vörösben és 443/620 zöldben. A képek kiértékelését az Adobe Photoshop CS3 programmal végeztük.

3.3.2 A Rotimer biokémiai vizsgálata SDS-Poliakrilamid gélelektroforézissel

Kísérletünk során számtalan típusú és preparált biopolimert futattunk meg. A vizsgálatban szereplő oldatok az 1. függelék 2. táblázatában megtalálhatók. A vizsgált fajokat (*E. dilatata*, *L. bulla*) 100 µl Laemli pufferbe homogenizáltuk műanyag homogenizátor segítségével, majd 5 perc forralás után lecentrifugáltuk (2000 g, 2 perc) a törmelék eltávolítása érdekében. A felülúszóból 10-10 µl-t tettünk egy 1,5 ml-es eppendorf csőbe. Ezen kívül az epoxy-fém gyöngy alapú módszerrel begyűjtött 20 µl RIK-et 40 µl forró 1xLaemli pufferbe eluáltuk, majd 5 perces 90 °C-os inkubálás után mágnessel az epoxy-partikulumokat eltávolítottuk. A 2 perces újra forralás után a 20 µl fehérje extraktumot összegyűjtöttük egy 1,5 ml-es eppendorf csőbe. Továbbá kontrollként használtuk a rotiferek tápanyagát és a tenyészetből levett médiumot, amelyet összekevertük az aktuális hordozóval. A tápanyagot lecentrifugáltuk (1500 g, 5 perc), hogy a sejtes elemeket eltávolítsuk, valamint hogy a maradék homogenizátumot kinyerjük. A kigyűjtött mintákat SDS-Poliakrilamid gélelektroforézis módszerrel futtattuk meg Page ruler prestained protein ladder mólsúly marker mellett. Az

elektroforézist 20 percen keresztül 90 V, majd 60 percen keresztül 120 V állandó feszültségen végeztük 1x Futtató pufferben. A gélfuttatás sikerességét Coomassie Brilliant Blue oldattal mutattuk ki, melyet festékeltávolító pufferrel történő mosás követett háromszor. A gélek digitalizálását szkennel segítségével végeztük el.

3.3.3 A Rotimer enzimekkel szembeni szenzitivitásának vizsgálata

Vizsgálatunk során kíváncsiak voltunk, hogy a képződött biopolimer milyen sajátosságokkal rendelkezik, pl. az összetétel szempontjából. Ennek érdekében *in situ* különböző enzimekkel kezeltük a RIK hálózatot, monitorozva annak szerkezeti integritását, esetleges szétesését és felbomlását. A kísérlet során alkalmazott állatokat Petri-csészékbe (55 cm²-es terület) gyűjtöttük, majd 20 kifejlett rotifert egy 24 lyukú well plate 1-1 lyukába helyeztünk, 1 ml munkatérfogattal. A Rotimer szekréciót indukáló epoxy részecskék végső koncentrációja 50 µg/ml volt, 1 mg/ml törzsoldatból hígítva. Két óra elteltével a médiumhoz óvatosan enzimeket (4.3, 1. táblázat) adtunk, ügyelve arra, hogy a pipetázás ne okozzon mechanikai roncsolást a képződött hálóban. A koncentrációkat a gyártók által ajánlott legmagasabb szinten alkalmaztuk. A biopolimer alapú képződmény stabilitását, vagy lebomlását mikroszkóp alatt (25x nagyítás) követtük és értékeltük ki. A háló 80%-os eltűnése jelentette a monitorozás végét egy adott vizsgálatban. Amennyiben ez a lebomlás bekövetkezett, a biopolimert az adott enzimre szenzitívnek értékeltük.

4. Eredmények és értékelésük

A Rotimer termelésének anatómiai hátterére és a képződött biopolimer biokémiai tulajdonságaira irányuló kísérletek eredményei az alábbiakban kerülnek bemutatásra.

4.1 A Rotiferek anatómiai vizualizálásának eredményei

4.1.1 A Rotifer organellumok és belső elhelyezkedésük detektálása

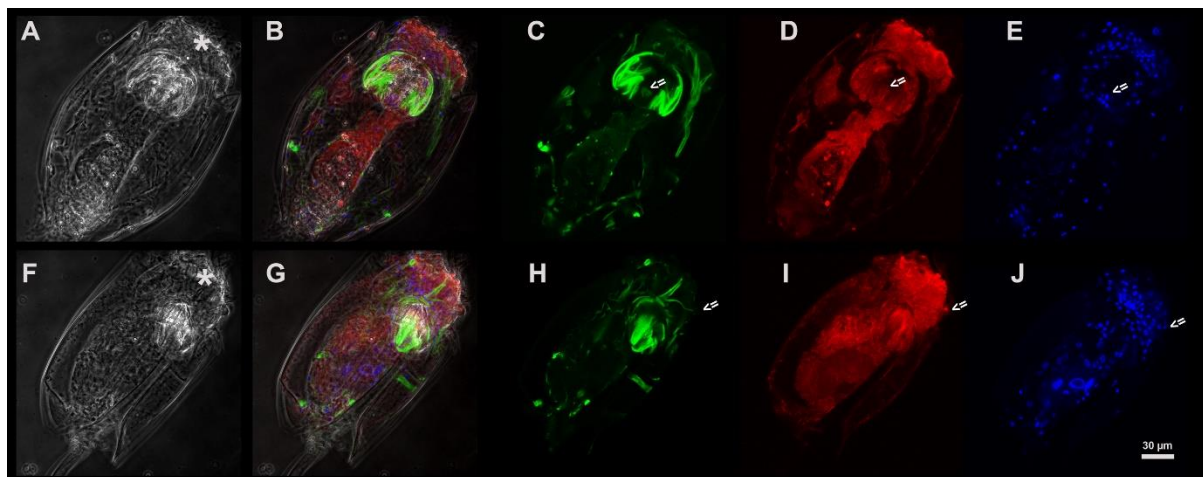
Vizsgálatainkból kiderült, hogy a rotiferek számos faja képes a Rotimer képzésére. Szakirodalmi leírásokból már a XVII. századtól ismert az általános rotifer anatómia, a testük felépítése, annak fénymikroszkópos dokumentálása. Vizsgálataink során nem számítottunk új szervek és képződmények felfedezésére, azonban célunk volt különböző funkcionalitású fluoreszcens festékekkel szelektíven jelölni az állatok testének belső felépítését. A legszélesebb sajátosságokkal rendelkező markereket alkalmaztuk, a sejtek, struktúrák, ciszták és formák vizualizálására. Bízunk benne, hogy a változatos festések feltárják a biopolimer termelésre feltételezhetően alkalmas organellumokat, azok elhelyezkedését, formáját. A célra a laboratóriumunkban meghonosított monoklonális kultúrák közül az *E. dilatata* rotifert véltük a legalkalmasabbnak. Minden vizsgálatot laterális és dorzális irányból is elvégeztünk konfokális mikroszkópiával. Első lépésben a sejtek eloszlására, lokális tömörüléseire, valamint az energetikai központok meghatározására és a testet biztosító izomzat rajzolatára voltunk kíváncsiak.

A DAPI láthatóvá tette a sejtmagokat (5. **ábra** E, J), amely nagyjából ezer sejt lokalizációjáról nyújtott információt. A legtöbb sejtmag a mastax és a fej környékén helyezkedik el, utalva arra, hogy az állatok számára a szenzoriális és táplálkozási szempontok mennyire központi jelentőségűek. Erre szükség is lehet, hiszen gyorsan és pontosan érzékelniük kell a környezet fiziko-kémiai sajátosságait, jellegzetességeit.

A Falloidin az aktin filamentumokat festette meg (5. **ábra** C, H), amely általános információt szolgáltat az állat mozgási struktúráiról. Főleg az állat fejéhez közeli régiókban lokalizálódik a festék, ahol nagyon jól kivehető az izmos mastax. A Rotimer képződésének és elvezetésének helyét úgy a sejtek, mint az izomzat formációiban sejteni lehet. Az tény, hogy önmagában egyik festés sem egyértelmű az anatómiai rajzolatot illetően, de az összes mérést együtt tekintve már visszakövethető a célterület és lokalizáció festésenként is.

A MitoTracker Red CMXRos a sejtek energiaigénye és energia felhasználása szerint mutatta be a rotiferek belső elrendeződését (5. **ábra** D, I). Ezek a sejt szervecskék szintén a fej és mastax közelében sűrűsödtek. Minden eredmény, de különösen a mitokondriális jelölések

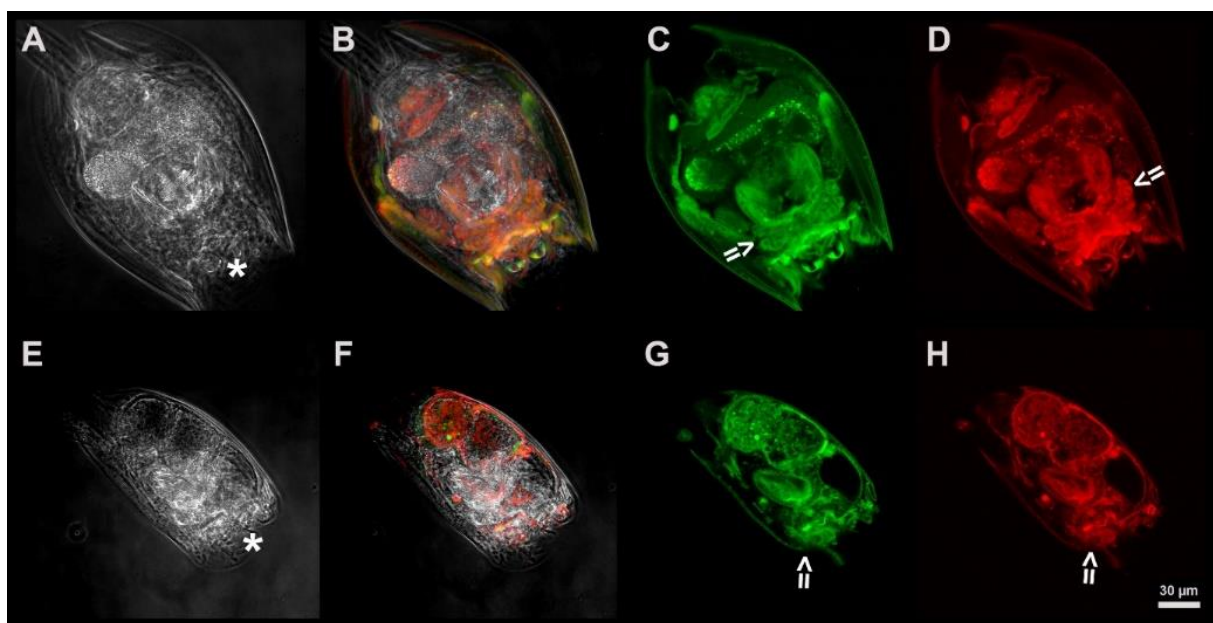
arra engednek következtetni, hogy egy esetleges intenzív szekrécióhoz szükséges aktivitást a nyaki-feji régióban kell keresnünk. Egy ilyen soksejtű, de mégis mikronos méretű állatban egyszerű és pragmatikus evolúciós fejlődést és kialakulást kell feltételeznünk.



5. ábra: *E. dilatata* dorzális (A-E) és laterális (F-J) anatómiai festése. Az aktin filamentumok zölddel (Falloidin), a mitokondriumok pirossal (Mitotracker Red CMXRos), a sejtmagokat pedig kékkel (DAPI) jelöltük. Jelölések: (A, F): fáziskontraszt kép (B, G): aktin filamentumok, mitokondrium, sejtmagok mix képe. (C, H): izomzat aktin filamentumai, (D, I): mitokondriumok, (E, J): sejtmagok. Az állat fejének pozíciója fehér csillaggal, a biopolimer lehetséges termelődésének helyét, továbbá a sipoly és az odavezető csatorna pozíciója fehér nyíllal jelölve.

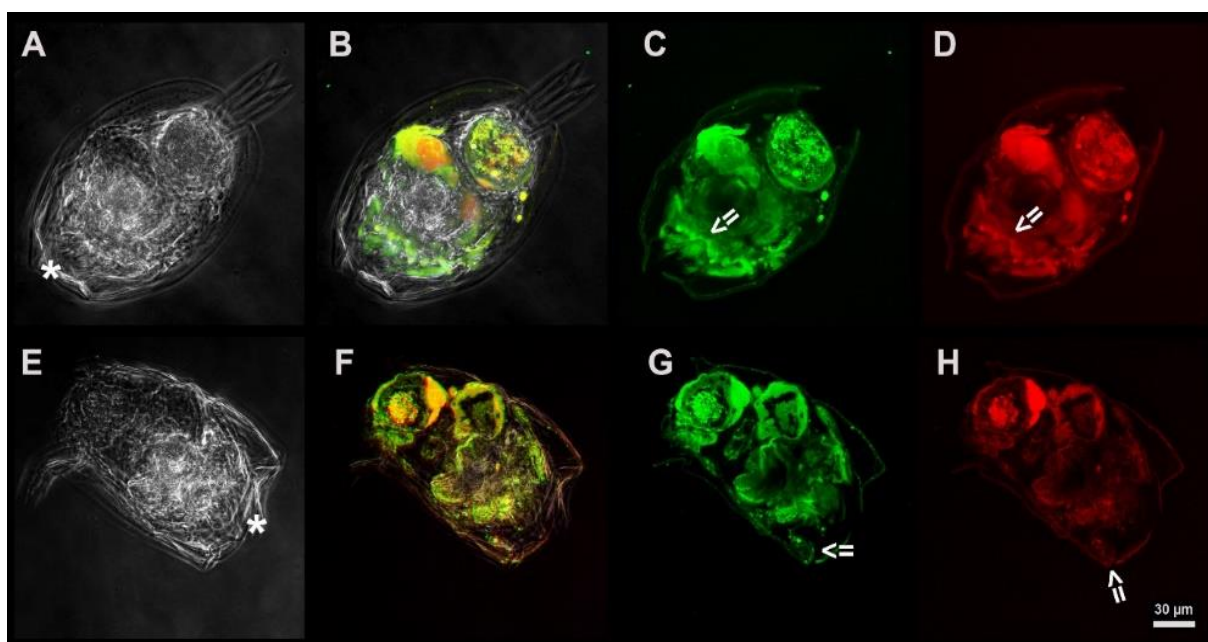
A rotiferek festése, különösképpen az élő állapotban rájuk adott típusok alkalmazása körülményesebb, mint pl. a sejtenyészetek, vagy az *ex vivo* szövetek esetén. Ezen élőlények sejtjei számára az alacsonyabb ozmolaritás (250 mg/L) az optimális, így bármely kémiai ágens könnyen destabilizálhatja a szervezetüket. A továbbiakban a kipróbált festékek közül három olyat is alkalmaztunk még, amelyek kompatibilisek a rotiferekkel, és a savas lizoszómák festése révén a szekréciós területek azonosítására szolgálhatnak.

A Neutral red részletgazdag rajzolatokat adott zöld és piros színben is az állat egész testére kiterjedően. Elméletileg a zöld (6. ábra C, G) és piros (6. ábra D, H) tartományok a semleges és savas lizoszómákat jelölte. Teljes állatot vizsgálva nehéz sejten belül jelölt organelumokkal párhuzamot felállítani, de az bizonyos, hogy a rotiferek teljes testükben tartalmaznak szekréciós sejteket. A nyak-fej régióban találtunk is olyan cisztákat, amelyek alkalmasak lehetnek a fajazonos biopolimer proformájának tárolására. További digitális nagyítást alkalmazva mirigy jellegű szerveket is tudtunk lokalizálni, valamint annak a feltételezett csatornának is a nyílását, amely későbbi transzmissziós optikai mikroszkópos felvételeken jól kivehetőek.



6. ábra: *E. dilatata* dorzális (A, D) és laterális (E-H) irányú festése Neutral red festékkel. A zöld (C, G) és piros (D, H) tartományok a savas vezikulumok és a nukleinsav lokalizációját jelölik. Jelölések: (A, E): fáziskontraszt kép; (B, F): mix kép. Az állat fejének pozíciója fehér csillaggal, a biopolimer lehetséges termelődésének helyét, továbbá a sipoly és az odavezető csatorna pozíciója fehér nyíllal jelölve.

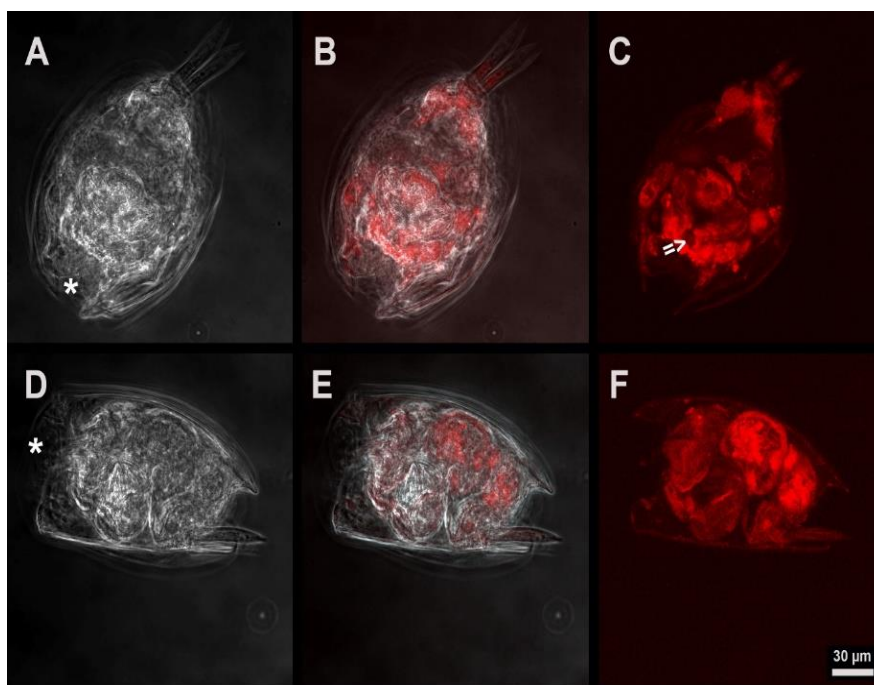
Az Acridin orange az előző kéthullámhosszú festékhez hasonlóan képes a semleges és a savas vezikulumok arányát kimutatni. Mindkét festék kapcsolódik a nukleinsavakhoz is, így elsősorban nem kvantitatív mérésenként, csupán funkcionális anatómiai jelölésekként alkalmaztuk őket. A zöld tartomány (7. ábra C, B) erősebben interferálhat a kettős szálú DNS



7. ábra: *E. dilatata* dorzális (A-D) és laterális (E-H) irányú organellumainak Acridin orange festése. Jelölések: (A, E): fáziskontraszt kép, (B, F): mix kép. (C, G): semleges vezikulumok és kettős szálú DNS festése (D, H): savas lizoszómák festése. Az állat fejének pozíciója fehér csillaggal, a biopolimer lehetséges kijutási helye fehér nyíllal jelölve.

tartalommal, azonban a vörös szín (7. ábra D, H) specifikusabb a savas lizoszómák jelenlétére. Jelen esetben, azonosan az előző festésekkel, a laterális és dorzális pozíciója az állatoknak különböző információkat szolgáltatott a szervek térbeli elhelyezkedéséről. Ez a festék szolgáltatta a legrészletgazdagabb felvételeket mind közül.

Mind a Neutral red, mind pedig az Acridin orange esetében megfigyelhetünk a test felső régióiban cisztákat, amelyek valószínűleg tároló funkciót látnak el. A LysoTracker esetében látható, hogy a festék az állat felső régióban halmozódik fel, de a szekréciós folyamatokra utaló festődést majdnem az egész testben találunk (8. ábra C, F).

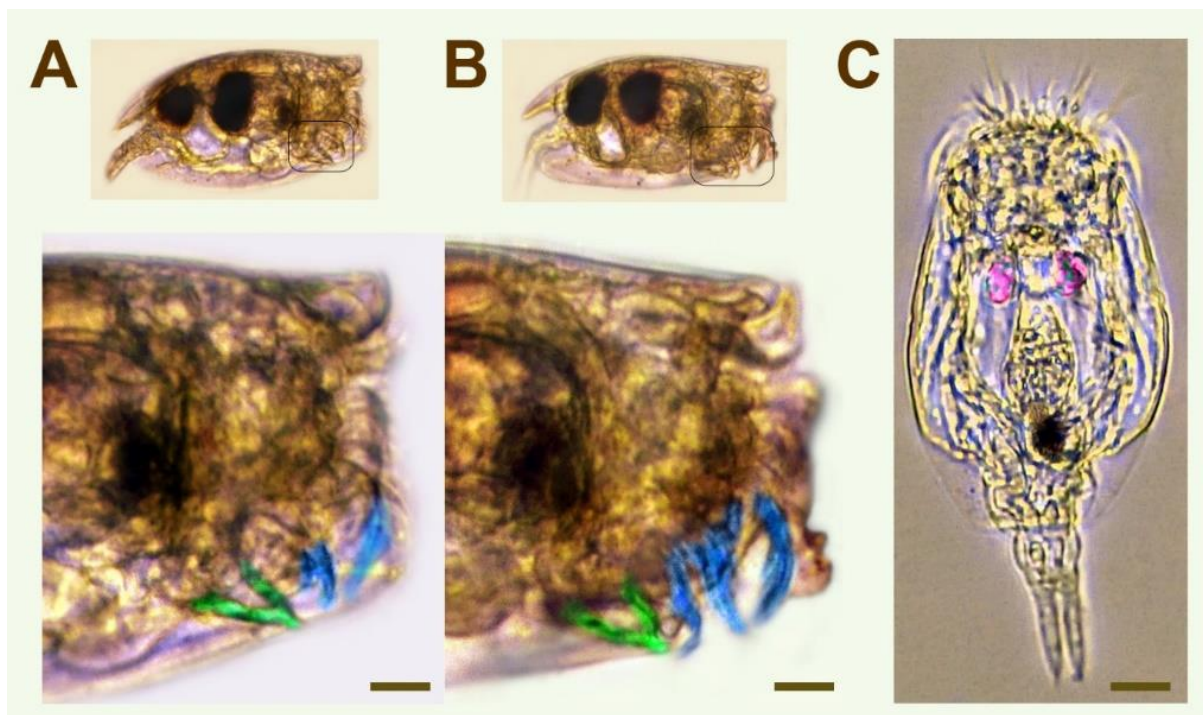


8. ábra: *E. dilatata* dorzális (A-C) és laterális (D-F) irányú jelölése LysoTracker Red festékekkel. A lizoszómális rendszert a piros színű festődés jelöli. Jelölések: (A, D): fáziskontraszt kép, (B, E): mix kép, (C, F): lizoszómális rendszer. Az állat fejének pozíciója fehér csillaggal, a biopolimer lehetséges termelődésének helyét, továbbá a sipoly és az odavezető csatorna pozíciója fehér nyíllal jelölve.

Összegezve a tapasztalatokat, a rotiferek testében nem találtunk olyan szekréciós területet, amely ismeretlen lett volna eddig az irodalomban. Így azt feltételezzük, hogy az eddig ismert szervek valamelyike képes a biopolimer előanyagának termelésére. Az a tény, hogy az állatok testében egyértelmű cisztás szerveződés, valamint nagyon aktív lizoszómális aktivitás van, azt sugallja, hogy a biopolimer szekréció elemi funkcionalitása ezen élőlényeknek.

A nőstény *E. dilatata* egyedeket vizsgálva, pl. biopolimer-fonalhúzás közben, sorozatos *in situ* fényképkészítéssel sikerült olyan felvételeket készítenünk, ahol látszik a kivezető csatorna és a sipolynak elnevezett nyílás (9. ábra A, B; digitálisan zölddel jelölve). Ez két különböző csatorna egységes torkolatát rajzolta ki. Sikerült dokumentálnunk azon csillós

„karmokat” is (9. **ábra** A, B; digitálisan kék színnel jelölve), amelyekkel az állatok kapaszkodni és a RIK fonalakat manipulálni (pl. összehúzni és összeragasztani) képesek.



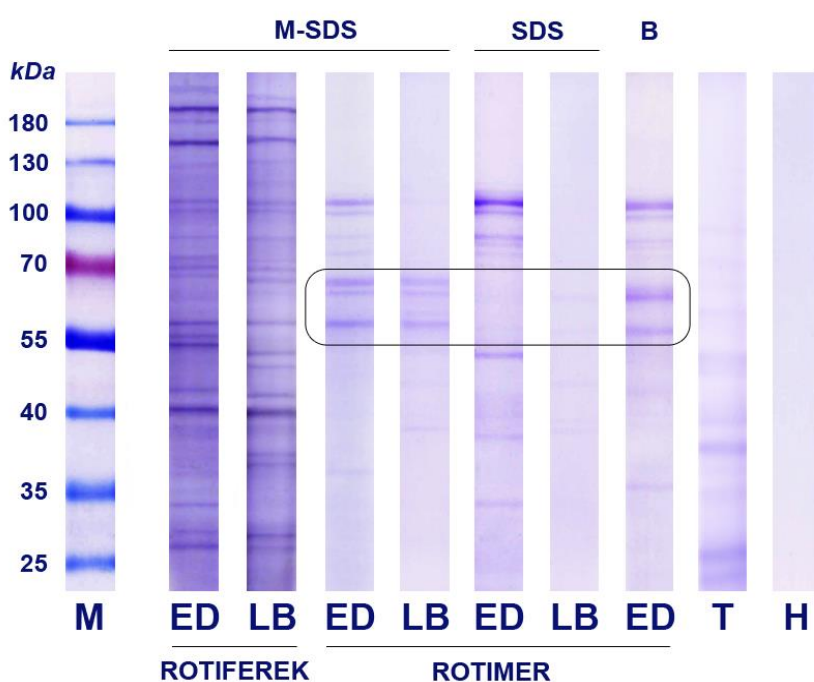
9. ábra: Az *E. dilatata* laterális (A, B) és hímjének dorzális (C) transzmissziós képe. Digitális színezés: csatorna és sipoly (zöld), csillós „karmok” (kék) és nyálmirigyek (rózsaszín). Méretsáv 30 μ m.

Külön kiemelendő, hogy a csillós karmokat még senki nem írta le az irodalomban ezen faj esetében. Ennek az anatómiai képződménynek a működése és további funkciója még feltárássra vár. A laterális felvételek alapján, összevetve a fluoreszcens képekkel, a keresett anatómiai képletek egyik részét megtaláltuk. A biopolimert termelő egységet a fluoreszcens képekből nem tudtuk egyértelműen beazonosítani, ugyanis a nőstényekben sok „zavaró” képlet található a testükben. Ekkor merült fel az a kérdés, hogy a – nagyon ritkán előforduló – hímek képeznek esetleg biopolimert? Méréseink feltárták, hogy a nem táplálkozó (csökevényes emésztőrendszer) hímek is képesek RIK képzésre. Megvizsgáltuk, hogy ezen kisméretű állatoknál milyen szerepüket megtartott szervek vannak, amely funkcionálisan alkalmasak lehetnek egy biopolimer szekrécióra. Egyedül és kizárólagosan csak a „mandulaszerű” nyálmirigyek jöhettek számításba (9. **Ábra** C; digitálisan rózsaszínre jelölve). A korábbi fluoreszcens képeken visszakövetve, több esetben is megtaláljuk a nyálmirigyeket, mint intenzíven festődő anatómiai képleteket, lizoszómális vezikulumokkal a belsejében.

A mikroszkópos monitorozás és detektálás valószínűsítette számunka a Rotimer szekréciós és formációs anatómiai képleteit, úgy, mint nyálmirigy, csatornák és sipoly-nyílás a külvilág fele.

4.2 SDS-Poliakrilamid gélelektroforézis eredményei

A munkánk másik nagy célkitűzése a Rotimernek, mint szerves anyagnak a molekuláris természetét tanulmányozni. Kidolgoztuk a minta izolációs protokollját, amely révén tanulmányozható adatokat kaptunk. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az *E. dilatata* és *L. bulla* Rotimerje egy komplex molekula, amely feltételezhetően több fehérjéből áll (10. ábra, keretezett részlet). A fehérje-gélelektroforézis során megfuttattuk mindkét állat teljes fehérjetartalmát, majd az izolált RIK-ből származó fehérjét (egységesen mindkét fajnál), annak csak SDS-el leoldott verzióját, valamint a kontroll jellegű tápanyagot és tenyésztési médiumot is.



10. ábra: Gélkép az *E. dilatata* és *L. bulla*, valamint az általuk kiválasztott Rotimer fehérje mintázataról. Rövidítések: ED: *Euchlanis dilatata*; LB: *Lecane bulla*; M-SDS: 2-Merkaptoetanol és SDS; SDS: nátrium(sodium)-dodecil-szulfát; T: tápoldat (sejtes elemektől mentesített homogenizátum); H: háttér (tenyésztési médium és induktor); B: Béta-Glükózidázal kezelt; M: mólsúly marker. A jelölt rész a feltételezett Rotimer komplex összetevőit tartalmazza.

Sajnálatos módon azt tapasztaltuk, hogy a RIK biopolimer tartalma valószínűleg kontaminálódik a rotiferek emésztő rendszeréből származó más fehérjékkel is. Ez azzal magyarázható, hogy az állatok elfogyasztják az emészthetetlen induktor partikulumok egy részét, vagyis az átmegy a tápcsatornájukon, találkozáva az ottani endoszinbionta baktériumokkal. Az *L. bulla* esetében a 110-es mólsúlyú sáv kevésbé van jelen, ugyanis ők kevesebb partikulumot fogyasztanak el. A tömegspektrométer ezt a sávot bakteriális fehérjeként azonosította. Ezen zavaró tényező kiküszöbölésén jelenleg is dolgozunk, pl. hímek képződésének stimulációjával, biopolimer termeltetéssel, ugyanis ők nem táplálkoznak. Az 10. ábrán jelölt fehérje sávok kizárólag csak merkaptoetanol jelenlétében jönnek le az induktor epoxy felületéről, csak SDS jelenlétében nem oldódik. Rotimer valószínűleg diszulfid kémiai kötésekkel van stabilizálva. Továbbá proteáz aktivitással nem rendelkező szénhidrát bontó

enzim jelenlétében a jellegzetes sávok megmaradnak, vagyis a Rotimer nagy valószínűséggel nem rendelkezik szerkezeti felépítést befolyásoló cukortartalommal.

A homogenizált állatok fehérjepaneljében szelektíven találtuk meg a feltételezett biopolimer komponenseket, mindkét fajra vonatkoztatva és hasonló mólsúlytartománnyal. A tápanyag tartalma is mutatott kisméretű fehérjéket, de az nem tartalmazott olyan mólsúlyú molekulát, ahol a feltételezett biopolimer komponensek jelentkeznek. A tenyészetből levett médium futtatása pedig nem mutatott egyáltalán jelet, vagyis az oldott fehérjék passzívan nem kötődnek az epoxy felülethez. Természetesen további vizsgálatokat igényel a Rotimer feltárása, mint például a rotiferek teljes genom és transzkriptom szekvenálása, annotációja, majd ezen információkat felhasználva a fehérje komplex összetételének meghatározása tömegspektrometriával. Ezek a mérések már folyamatban vannak.

4.3 A Rotimer enzimszenzitivitásának vizsgálatai

A gélelektroforézissel kapott eredményeink egyértelműen rávilágítottak arra, hogy a Rotimer egy fehérje komplex. Azonban a mi további érdeklődésünk arra irányult, hogy a biopolimer központi struktúráját csak peptid kötéssel rendelkező aminosav/fehérje komponensek alkotják, vagy esetleg más jellegű szerves anyag is, mint pl. cukrok vagy zsírok. A kérdésre a választ *in situ* RIK hálózat integritásának méréssel vizsgáltuk, egy adott enzimmel való kezelés ideje alatt, maximum 3 órán keresztül. Minden enzimnél figyelembe vettük annak optimális működési paramétereit (hőmérséklet, pH, koncentráció) és a közeget ahhoz igazítottuk. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a biopolimer képes-e megőrizni integritását különböző típusú fehérjebontó, szénhidrátbontó és lipidbontó enzimek jelenlétében (**1. táblázat**). A RIK a proteázok többségének alkalmazása alatt elvesztette az integritását, majd teljesen megemésztődött, ami arra utal, hogy a Rotimert részben vagy egészben fehérje típusú anyag alkothatja. Érdekes megjegyezni, hogy minden olyan enzim, amely bontotta a hálózatot, toxikus is volt a rotiferekre, valamint fordítva. A RIK megőrizte eredeti integritását a Lipáz és a legtöbb szénhidrát bontó enzim mellett, vagyis a biomolekulának nincs lényegi strukturális cukor vagy lipid alkotóeleme. A proteáz aktivitással is rendelkező cukorbontó enzimek tudták destabilizálni a RIK makrostruktúrát. Továbbá az is megfigyelhető, hogy egyes enzimek, mint a Béta-glükozidáz (nincs proteáz aktivitása) és a Novozim 234 elasztikussá alakítják a molekulát. Ez azt jelenti, hogy nem tudták emésztetni a fonalakat, de nyúlósabbá, rugalmasabbá tették azt. Ezen empirikus megfigyelés közvetett módon utalhat arra, hogy szénhidrát jellegű komponensek lehetnek másodlagos stabilizálókként a Rotimer komponensei. Természetesen

ezen pilot mérések további vizsgálatokat kívánnak, de szakmailag jó orientációs markerekként szolgálnak.

1. táblázat

Fehérjebontó enzimek	Rotimer állapota
Tripszin	B
Kimotripszin	B
Papain	B
Proteináz-K	B
Karboxipeptidáz A	NB
Karboxipeptidáz B	NB
Kollagenáz	NB
Proteináz S	B
Szénhidrátbontó enzimek	
Alfa-amiláz és glükamiláz	NB
Pektináz	NB
Béta-glükozidáz	NBE
Lizozim	NB
Celluláz	NB
Kitaláz	B
Zimoliáz	B
Maceráz, Pektináz	NB
Béta-glükuronidáz	NB
Laminaráz	NB
Pullulanáz	NB
Novozim 234	NBE
Hemicelluláz	NB
Lipidbontó enzimek	
Lipáz	NB

B: Az enzim igen, bontja a Rotimert (zöld jelölés)

NB: Az enzim nem bontja a Rotimert (piros jelölés)

NBE: Az enzim nem bontja a Rotimert, de igen, elasztikussá teszi azt.

5. Összefoglalás

A rotiferek parányi méretű, vízben élő, kozmopolita mikrometazoák, amelyek alkalmazott modellek a toxikológiai, öregedési és farmakológiai kutatásokban. Az *E. dilatata* és az *L. bulla* által kiválasztott Rotimer egy multifunkcionális, külső eredetű, biopolimer jellegű, vízben nem oldódó molekula, mely termelését bizonyos méretű induktorok stimulálják és ennek hatására egy hálózatos Rotimer-Induktor Konglomerátum keletkezik. Megállapítottuk, hogy a vizsgált exudátum termelés univerzális a rotiferek körében, viszont részleteiben különböznek. Ezen felül a molekula egy több fehérjéből álló komplexet alkot, amely ragacsos és fonalas formában fordulhat elő. A biopolimer termelés kalciumion és hidrofíl felületfüggő folyamat, valamint rendkívül viszkoelasztikus és nagy szakítószilárdsággal rendelkezik. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok rámutattak arra, hogy az állatok sejtmagjai és mitokondriumai a fejben, illetve a mastax közelében koncentrálnak, amely információt szolgáltat a sejtek lokalizációjáról és energiafelhasználásukról. Továbbá általános képet kaptunk az állatok aktin filamentális rendszeréről. Ezen kívül megfestettük a kiválasztó szervrendszert, ahol a hímeknél kirajzolódtak cisztaszerű hólyagok, amelyekről feltételezzük, hogy a biopolimer előanyagának tárolási funkcióját láthatja el az exudációs folyamatban. A rotifer testében nem találtunk olyan szekréciós területet, amely ismeretlen lett volna eddig az irodalomban, így feltételezzük, hogy az ismert szervek valamelyike képes a biopolimer termelésére. Valószínűleg ezt a funkciót – a felvételeinken is megfigyelhető – nyálmirigy tölti be, a hozzá tartozó kivezető sipoly csatornával együtt, amelyet azonban ilyen kétágú formában még nem írtak le eddig. A Rotimer molekuláris sajátosságainak feltárásához enzimes emésztést és SDS fehérje gélelektroforézist használtunk, amelyek eredményeként megállapítottuk, hogy a biomolekulát az enzimek szelektíven bontják, illetve, hogy SDS rezisztens és proteáz szenzitív. A biopolimer nagy valószínűséggel nem rendelkezik olyan szénhidrát és lipid tartalommal, ami befolyásolná a szerkezeti stabilitását. Eredményeink alapján továbbá azt feltételezzük, hogy a molekula nagyrészt kalcium kötő és emellett a konformációjának periferikus részén (a vízmolekulákkal való érintkezési pontjain) hidrofób aminosav összetételű. Ilyen alkotók lehetnek a Tirozin, Triptofán, Metionin, Leucin, Fenilalanin, Arginin és a Lizin. Eredményeink hozzájárulnak a Rotimer képzésének anatómiai feltárásához és összetételének megismeréséhez monogonant fajok esetében. Terveink között szerepel a teljes genom és transzkriptom szekvenálás, valamint tömegspektrometriai mérés és *in silico* modellezés, feltárva ezzel a biopolimer összetételét és szerkezetét.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Datki Zsolt Lászlónak (SZTE, Interdiszciplináris Kutatásfejlesztési és Innovációs Kiválósági Központ, *Micro-In Vivo* biopolimer kutató csoport) és Dr. Sinka Ritának (SZTE, TTIK, Genetikai Tanszék), valamint köszönet illeti mindazokat, akik hasznos tanácsaikkal és értékes észrevételeikkel segítették munkámat.

7. Irodalomjegyzék

- Balazs E., Galik-Olah Z., Galik B., Somogyvari F., Kalman J., Datki Z., External modulation of Rotimer exudate secretion in monogonant rotifers, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 220 (2021), 112399.
- Błędzki, L. A. and Ellison, A. M. 2003. Diversity of rotifers from northeastern U.S.A. bogs with new species records for North America and New England. *Hydrobiologia* 497: 5362.
- Carlin, B. 1943. Die Planktonrotatorien des Motalastrom. *Medd. Lunds Univ. Limnol. Inst.* 5: 1-256.
- Chandra, R. Rustgi, R. 1998. Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* 23, 1273–1335.
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54:579–599.
- Crowe JH. 1971. Anhydrobiosis – Unsolved problem. *Amerikan Naturalist* 105:563–573.
- Datki Z., Acs E., Balazs E., Sovany T., Csoka I., Zsuga, Kalman K. J., Galik-Olah Z., Exogenic production of bioactive filamentous biopolymer by monogonant rotifers, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208 (2021), 111666.
- Datki Z., Balazs E., Galik B., Sinka R., Zeitler L., Bozso Z., Kalman J., Hortobagyi T., Galik-Olah Z., The interacting rotifer-biopolymers are anti- and disaggregating agents for human-type beta-amyloid in vitro, *Int. J. Biol. Macromol.* 201 (2022) 262–269.
- Datki Z., Galik-Olah, Z. Bohar, Zadori Z., Fulop D., Szatmari F., Galik I., Kalman, B., J. Vecsei, L. 2019. Kynurenic acid and its analogs are beneficial physiologic attenuators in bdelloid rotifers. *Molecules* 24, 2171.
- Datki Z., Olah Z., Hortobagyi T., Macsai L., Zsuga K., Fulop Z., Bozso Z., Galik B., Acs E., Foldi A., Szarvas A., Kalman J., Exceptional in vivo catabolism of neurodegeneration-related aggregates, *Zool. Lett.* 4 (2018) 1–12.
- Dehl, E. 1934. Morphologie von *Lindia tectusa*. – *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 145: 169–219.
- Ehrlich, H. 2019. *Marine Biological Materials of Invertebrate Origin*. Springer International Publishing AG.
- Ejsmont-Karabin J., Does the world need faunists? Based on rotifer (Rotifera) occurrence reflections on the role of faunistic research in ecology, *Int. Rev. Hydrobiol.* 104 (2019) 49–56.
- Ejsmont-Karabin, J. Siewertsen, K. and Gulati, R. D. 1993. Changes in size, biomass, and production of *Euchlanis dilatata lueksiana* Hauer during its lifespan. *Hydrobiologia* 255/256: 77-80.

- Eyres I., Boschetti C., Crisp A., Smith T.P., Fontaneto D., Tunnacliffe A., Barraclough T. G., Horizontal gene transfer in bdelloid rotifers is ancient, ongoing and more frequent in species from desiccating habitats, *BMC Biol.* 13 (2015).
- Fontaneto, D. Flot, J. F. & Tang, C. Q. (2015). Guidelines from DNA taxonomy with focus on the meiofauna. *Marine Biodiversity*, 45, 433–451.
- Fontaneto, D. Westberg, M. Hortal, J. 2011. Evidence of weak habitat specialisation in microscopic animals. *PLoS One* 6, e23969.
- Ganesana, A.R. Guru, M.S. Balasubramanian, B. Mohan, K. Liu, W.C. Arasu, M.V. Al- Dhab, Duraipandiyar N. A., Ignacimuthu V., Sudhakar S., Seedevis M. P., P. 2020. Biopolymer from edible marine invertebrates: a potential functional food. *J. King Saud. Univ. Sci.* 32, 1772–1777.
- García-Morales, A. E. & Elías-Gutiérrez, M. (2013). DNA barcoding of freshwater Rotifera in Mexico: evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecology Resources*, 13, 1097–1107.
- Glime, J. M. 2017. Invertebrates: Rotifer Taxa – Monogononta. Chapt. 4-7a. In: Glime, J. M. *Bryophyte Ecology. Volume 2. 4-7a-1 Bryological Interaction*. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists.
- González-Pérez B. K., Sarma S. S. S., Nandini S., Effects of selected pharmaceuticals (ibuprofen and amoxicillin) on the demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera), *Egypt. J. Aquat. Res.* 42 (2016) 341–347.
- Gulati, R. D., Ejsmont-Karabin, J. and Postema, G. 1993. Feeding in *Euchlanis dilatata* Hauer on filamentous Cyanobacteria and a prochlorophyte. *Hydrobiologia* 255/256: 269-274.
- Hassan, M.E. Bai, J. Dou, D.Q. 2019. Biopolymers; definition, classification and applications. *Egypt. J. Chem.* 62, 1725–1737.
- Hennebert, E. Gregorowicz, E. Flammang, P. 2018. Involvement of sulfated biopolymers in adhesive secretions produced by marine invertebrates. *Biol. Open* 7, bio037358.
- Hwang D. S., Suga K., Sakakura Y., Park H. G., Hagiwara A., Rhee J. S., Lee J. S., Complete mitochondrial genome of the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus* (Rotifera, Brachionidae), *Mitochondrial DNA* 25 (2014) 29–30.
- Jersabek, C. D. 2016. *Euchlanis dilatata*. Rotifer World Catalog.

- Jersabek, C. D., Segers, H. and Morris, P. J. 2003. An illustrated online catalog of the Rotifera in the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.
- Jönsson, K. Wojcik A. I. 2017. Tolerance to X-rays and heavy ions (Fe, He) in the Tardigrade *Richtersius coronifer* and the Bdelloid Rotifer *Mniobia russeola*. *Astrobiology* 17, 163–167.
- Kanazawa, M. Nanri, T. Saigusa, M. 2017. Anhydrobiosis affects thermal habituation in the Bdelloid Rotifer, *Adineta* sp. *Zool. Sci.* 34, 81–85.
- Koste, W. & Shiel, R. J. (1990). Rotifera from Australian inland waters V. Lecanidae (Rotifera: Monogononta). *Transactions of the Royal Society of South Australia*, 114, 1–36.
- Koste, W. and Shiel, R. J. 1989. Rotifera from Australian inland waters. III. Euchlanidae, Mytilinidae and Trichotriidae (Rotifera: Monogononta). *Trans. Royal Soc. Austral.* 113: 85-114.
- Kuczynska-Kippen, N. (2007). Interactions of con-generic Lecane species (Rotifera) within different macrophyte patches in a shallow lake. *Polish Journal of Ecology*, 55, 91–100
- Macasai L., Olah Z., Bush A. I., Galik B., Onody, Kalman R. J., Datki Z., Redox modulating factors affect longevity regulation in rotifers, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 74 (2019) 811–814.
- Manuel Barrabin, J. de. 2000. The rotifers of Spanish reservoirs: Ecological, systematical and zoogeographical remarks. *Limnetica* 19: 91-167.
- Martini, E. 1912. Studien über die Konstanz histologischer Elemente. III. Hydatina senta. – *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 102: 425–645.
- Mills, S. Alcántara-Rodríguez, J. A. Ciro-Pérez, J. Gómez, A. Hagiwara, A. Hinson, K. et al. (2017). Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, 796, 39–58.
- Muhlia-Almazán, A. Sánchez-Paz, A. García-Carréno, F.L. 2008. Invertebrate trypsins: a review. *J. Comp. Physiol. B* 178, 655–672.
- Nachtwey, R. 1925. Untersuchungen über die Keimbahn Organogenese und Anatomie von *Asplanchna priodonta* Gosse. – *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 126: 239–492.
- Niaounakis, M. 2015. *Biopolymers: Application and Trends*. Published by Elsevier Inc.
- Nowell R. W., Almeida P., Wilson C. G., Smith T. P., Fontaneto D., Crisp A., Micklem G., Tunnacliffe A., Boschetti C., Barraclough T. G., Comparative genomics of bdelloid rotifers: insights from desiccating and nondesiccating species, 2018.
- Olah Z., Bush A. I., Aleksza D., Galik B., Ivitz E., Macasai L., Janka Z., Karman, Kalman Z. J., Datki Z., Novel in vivo experimental viability assays with high sensitivity and throughput capacity using a bdelloid rotifer, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144 (2017) 115–122.

- Olatunji, O. 2020. Aquatic biopolymers, understanding their industrial significance and environmental implications. Springer International Publishing.
- Pejler, B. 1962. Taxonomic notes on some planktic fresh-water rotifers. Zool. Bidr: Uppsala 35: 307-319.
- Peters, F. 1931. Untersuchungen über Anatomie und Zellkonstanz von *Synchaeta* (*S. grimpei* Remane, *S. baltica* Ehr. *S. tavina* Hood and *S. triophthalma* Laut.). Ein Beitrag zur Frage der Artunterschiede bei konstantzelligen Tieren. – Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie 139: 1–119.
- Plewka, Michael. 2016. Plingfactory. Accessed August 2016 at <<http://www.plingfactory.de/Science/Atlas/Artenlisten/RotiferEArtList1.html>>.
- Ricci C. & Fontaneto D., The importance of being a bdelloid: Ecological and evolutionary consequences of dormancy, Italian Journal of Zoology, September 2009; 76(3): 240–249.
- Ricci C. 1998. Anhydrobiotic capabilities of bdelloid rotifers. Hydrobiologia 387/388:321–326.
- Ricci C. 2001. A reconsideration of the taxonomic status of *Macrotrachela quadricornifera* (Rotifera, Bdelloidea). Journal of Zoology 255:273–277.
- Ricci C., Boschetti C., Bdelloid rotifers as model system to study developmental biology in space, Adv. Space Biol. Med. 9 (2003) 25–39.
- Ricci C., Perletti F. 2006. Starve and survive: Stress tolerance and life-history traits of a bdelloid rotifer. Functional Ecology 20:340–346.
- Rico-Martínez R., Arzate-Cárdenas M. A., Robles-Vargas D., Pérez-Legaspi I. A., Alvarado-Flores J., Santos-Medrano G. E., Rotifers as models in toxicity screening of chemicals and environmental samples, in: Invertebr. - Exp. Model. Toxic. Screen, 2016
- Robeson, M.S. King, A.J. Freeman, K.R. Birky Jr. C.W. Martin, A.P. Schmidt, S.K. 2011. Soil rotifer communities are extremely diverse globally but spatially autocorrelated locally. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 4406–4410.
- Sarma, S. S. S, Nandini, S. Gama-Flores, J. L., and FernandezAraiza, M. A. 2001. Population growth of *Euchlanis dilatata* (Rotifera): Combined effects of methyl parathion and food (*Chlorella vulgaris*). J. Environ. Sci. Health, Part B: Pesticides Food Contam. Agric. Wastes 36: 43-54.
- Segers, H. & Rico-Martínez, R. (2000). The male of *Lecane bulla* (Gosse, 1851): new support for the synonymy of *Lecane Nitzsch*, *Monostyla Ehrenberg* and *Hemimonostyla Bartos*. Journal of Natural History, 34, 679–683.

- Segers, H. (1995). Rotifera. Vol. 2: The Lecanidae (Monogononta). In H.J.F. Dumont (Ed.), Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the World, Vol. 6 (pp. 1–226).
- Segers, H. (1996). The biogeography of littoral Lecane Rotifera. *Hydrobiologia*, 323, 169–197.
- Segers, H. (2007). Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, 1564, 1–104.
- Shain, D. H. Halldórsdóttir, K. Pálsson, F. Aðalgeirsdóttir, G. Gunnarsson, A. Jönsson, Þ, Lang, S. A. Pálsson, H. S. Steinþórsson, S. Arnason, E. 2016. Colonization of maritime glacier ice by bdelloid Rotifera. *Mol. Phylogenet. Evol.* 98, 280–287.
- Silva, M.A. da, Bierhalz, A.C.K. Kieckbusch, T.G. 2009. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydr. Polym.* 77 (4), 736–742.
- Snell, T.W. Johnston, R.K. Matthews, A.B. Zhou, H. Gao, M. Skolnick, J. 2018. Repurposed FDA-approved drugs targeting genes influencing aging can extend lifespan and healthspan in rotifers. *Biogerontology* 19, 145–157.
- Snell, T.W. Rotifers as models for the biology of aging, *Int. Rev. Hydrobiol.* 99 (2014) 84–95.
- Snell, T.W.; Johnston, R.K.; Matthews, A.B. Freshwater toxicity testing using rehydrated *Philodina* sp. (Rotifera) as test animals. *Environ. Toxicol.* 2017, 32, 2267–2276.
- Stoßberg, K. 1932. Zur Morphologie der Radertiergattung *Euchlanis*, *Brachionus* und *Rhinoglena*. – *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* 142: 313–424.
- Wallace RL, Snell TW, Ricci C, Nogrady T. 2006. Rotifera: Volume 1 Biology, ecology and systematics. 2nd ed. In: Segers H, editor. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world, Vol.23. Leiden: Kenobi Productions, Ghent, and Backhuys Publishers.
- Walsh, E. J. Schröder, T. Wallace, R. L. & Rico-Martínez, R. (2009). Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 30, 1046–1050.

8. Függelék

1. Függelék

1. Táblázat

PBS (phosphate-buffered saline) 400 ml:

3,2 g NaCl
0,08 g KCl
0,576 g Na₂PO₄
0,096 g KH₂PO₄

PBSTX:

1x PBS
0,3% Triton-X100
0,1% Tween20

DAPI+Falloidin festő oldat 500 µl:

500 µl 1x PBS
1 µl DAPI
1,25 µl Falloidin

Neutral red festő oldat:

50 µg Neutral red

LysoTracker festő oldat:

0,1% DMSO
50 µl LysoTracker

PBST:

1x PBS
0,1% Triton-X100

Fixáló oldat 50 ml:

15 ml 60 mM PIPES
1,5 ml 30 mM HEPES
1 ml 10 mM EGTA
0,2 ml 4 mM MgSO₄

MitoTracker Red CMXRos festő oldat:

0,2% 94 µl DMSO
50 µg MitoTracker

Acridin orange festő oldat:

0,2% 94 µl DMSO
50 µg MitoTracker

2. Táblázat

Laemmli puffer:

60 mM Tris-HCl
2% SDS
0,01% Brómfenolkék
5% Béta-merkaptoetanol

Coomassie Brilliant Blue oldat:

Coomassie blue R-250
40% etanol
10% ecetsav

5% SDS-Poliakrilamid gél (stacking) 2 ml:

1,4 ml desztillált víz
0,33 ml akrilamid mix (30%)
0,25 ml 1M Tris-HCl pH:6,8
0,02 ml SDS (10%)
0,02 ml ammónium perszulfát (10%)
2 µl TEMED

Futtató puffer:

20 mM Tris-HCl
190 mM Glicin
0,1% SDS

10% SDS-Poliakrilamid gél (resolving) 10 ml:

1,9 ml desztillált víz
1,7 ml akrilamid mix (30%)
1,3 ml 1,5M Tris-HCl pH8,8
0,05 ml SDS (10%)
0,05 ml ammónium perszulfát (10%)
0,002 µl TEMED

Transzfer puffer:

20 mM Tris-HCl
190 mM Glicin
20% metanol

Festék eltávolító puffer 500 ml:

200 ml 96 % etanol
50 ml ecetsav
250 ml desztillált víz

A 36. TDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Sipos András** nyilatkozom, hogy a 36. TDK-ra benyújtott

A rotifer specifikus biopolimerek képzésének anatómiai háttere és biokémiai jellemzése
című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat^{1*}	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán[#] jellemezve)
<i>A vizsgálendő állatok tenyésztése/izolálása¹</i>	<i>4</i>
<i>A vizsgálendő anyag (Rotimer) termeltetése és izolálása, előkészítése vizsgálatokra²</i>	<i>3</i>
<i>A festési eljárások tervezése, kivitelezése és a minták mikroszkópos vizsgálata³</i>	<i>5</i>
<i>A pályamunkában leírt SDS-PAGE elvégzése, az eredmények kiértékelése⁴</i>	<i>1</i>
<i>Az minták (Rotimer) enzimes kezelése és eredmények érértékelése⁵</i>	<i>1</i>

Kelt: Szeged, 2022. 11. 14.

Sipos András

Pályamunkát benyújtó hallgató (név)
alírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Dr. Datki Zsolt László (SZTE, IKIKK)

Témavezető (név, munkahely)
alírása