

Az intraspecifikus polimorfizmus és prokarióta szimbioták vizsgálata klonálisan szaporodó amöboid egysejtű szervezeteknél

Témaszám: T49632

Eredeti futamidő: 2005. január 01.-2008. december 31.

Engedélyezett módosítás: - 2009. december 31.

Közreműködők

A projekt egyetlen támogatott résztvevője a pályázat során a témavezető volt. Két évben bedolgozóként a pályázatból fizetve egy asszisztens segített a manuális munkák egy részének elvégzésében.

Török Júlia Katalin	témavezető	
Seregi Tímea	asszisztens	amöbba tenyészetek gondozása 2005-2006

A pályázat megvalósítása során bizonyos résztémák megvalósításában közreműködtek kollégák és hallgatók, az alábbi tevékenységekkel:

Bartha Zsuzsanna	biológus hallgató	baktérium tenyészetek gondozása, TDK
Csikós György Dr.	ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődéstani Tanszék	Fluoreszcens mikroszkóp használata, konfokális lézermikroszkóp használata, TEM használata, western blot
Heéger Zsófia	doktorandusz	Kezdetben a baktérium tenyészetek gondozása; később doktori témája részeként <i>Arcella</i> endocitobionták molekuláris karakterizálása DGGE-vel
Kiss Csaba	doktorandusz	<i>Bacillus cereus</i> tenyésztési módszerrel történő azonosítása a szekvenciából <i>B. thuringiensis</i> -ként azonosított törzsből
Márialigeti Károly DSc	tanszékvezető, ELTE Mikrobiológiai Tanszék	Szakmai konzultáció, a fluoreszcens mikroszkóp és más tanszéki eszközök többszöri használata, <i>Enterobacter aerogenes</i>
Molnár Orsolya PhD	biológus	mikrogombák témakörben szakmai konzultáció, gomba vizsgálatok egy része, baktérium tenyészetek gondozása
Pollák Beatrix	doktorandusz	a gazdaszervezet belsejének jellegét imitáló mR2 táptalaj összetételének kidolgozása, kezdeti molekuláris munkák
Számos kolléga, ismerős		Vízminták gyűjtése

1. Táblázat. A pályázat megvalósításában közreműködők és tevékenységük.

A pályázat megvalósítása

A munkakörülmények kialakítása, változások a pályázatban írtakhoz képest

A vizsgálati módszerek egy részét rövid tanulmányutakon sajátítottam el. A *fluoreszcens in situ hibridizáció* (FISH) egysejtű tenyészeteken történő alkalmazását Sergei Fokin (Pisai Egyetem, Szentpétervári Állami Egyetem) protozoológusnál ismertem meg. Másféle labor- és kísérleti körülmények között tanulmányoztam a FISH módszert, valamint a PCR alkalmazását Nikolausz Marcell (UFZ Lipcse) segítségével. Ezek az OTKA-tól független finanszírozású tanulmányutak segítettek az itthoni labor körülmények kialakításában, immár pályázati forrásból. A tervezett költségvetéshez képest csupán kisebb eltérések történtek, két alkalommal pénzügyi átcsoportosítás révén jutottam hozzá az előre nem látott de szükséges eszközökhöz (Partec CyScope mikroszkóp és Problot Rocker síkrázó). 2005-ben 90000Ft állami elvonására került sor, ennek hátrányát a pályázat futamidejének végefelé éreztem meg.

A vizsgálati objektumok körének behatárolása

A projekt célcsoportját amöboid szervezetek képezik. A korábbi tevékenységem során vizsgált házas amöbák közül (Amoebozoa: Arcellinida és Cercozoa: Filosea) az Arcellinidákra szűkítettem a kutatást, mert ezekről semmilyen publikált szekvenciaadat nem létezett a pályázat megírásának idején, Filoseákra viszont már igen (Wylezich és mtsai 2002). A téma azonban már a „levegőben volt”, hiszen az utóbbi 10 évben azon élőlénycsoportoknál is megkezdődtek a molekuláris filogenetikai vizsgálatok, amelyeknél addig csak morfológiai vizsgálatokat végeztek. 2005-ben jelent meg egy svájci kutatógárda tollából az első cikk, amely az Arcellinida csoport több genusát – köztük egy akkor még tévesen *Arcella*ként azonosított fajt – elhelyezte az Amoebozoa törzsfán (Nikolaev és mtsai 2005). A további molekuláris filogenetikai kutatások a Hyalospheniidae család fajain folytatódtak, nem érintve az általam vizsgált *Arcella* genus (Lara és mtsai 2008). 2008-ban jelent meg egy következő cikk, amelyben egy kereskedelmi törzsgyűjteményből származó *Arcella hemisphaerica* parciális 18S rRNS gén szekvenciáját közölték csupasz amöbák mellett (Tekle és mtsai 2008). Eddig csupán parciális 18S rRNS gén szekvenciákat publikáltak az Arcellinidák körében. *Arcella* parciális 18S rRNS gén szekvencia a zárójelentés írásának idején csupán egy van (EU273445, 1392 bp) az EMBL adatbázis alapján (Tekle és mtsai 2008). Csupasz amöbák csak a bakteriális szimbionták keresésére kerültek a vizsgálat látóterébe a kapcsolódó PhD téma erejéig.

Egyetlen genus, az *Arcella* Ehrenberg, 1832, a csoport névadó képviselője köré szerveztem a vizsgálatokat, arra alapozva, hogy a tenyészetek létrehozása és fenntartása különböző sikerrel történik a különböző genusoknál (ebben időközben saját tapasztalataim is megerősítettek). Korábbi tanulmányutam (1994, Ralf Meisterfeld, RWTH Aachen) alkalmával meggyőződtem róla, hogy ennek a genusnak több fajtát lehetséges tenyészetben tartani, bár a sikeres molekuláris munka érdekében a saját tenyésztési módszert kellett kidolgoznom. Az *Arcella* fajok háza nem tartalmaz agglutinált szemcséket, kizárólag fehérjéből áll, áttetsző és vagy lapított vagy közel félgömb alakban kidomborodó, de mikroszkóppal könnyen tanulmányozható. A különböző fajok mérete 45-250µm között oszlik meg, mikropipettával egyedileg is könnyen kezelhetők.

Metodikai nehézségek

A környezeti mintákból az egysejtű izolálása elég lassan megy, ezért a nyári nagy minta mennyiségnek rendszerint csak a töredékéből tudtam működő tenyészeteket kialakítani. Pár nap alatt a mintában élő érzékenyebb *Arcella* fajok elpusztulnak. Izolálást követően is csak kevés izolált példány (kb. 10%) kezd el osztódni. Egyes fajokot erőfeszítéseim ellenére sem

sikerült tenyésztésem (*A. conica*, *A. arenaria*, *A. megastoma*). Már 2005-ben sikerült az első *Arcella* fajt tartósan tenyésztetbe vonni és véletlen folytán éppen ez maradt fenn végig minden további mellett (A1 – *Arcella intermedia*). 2006-ban volt egyidejűleg jelen a legtöbb tenyésztet (31), ekkor még azzal a céllal, hogy egy tartós kísérleti-anyag bázist hozzak létre. Ez a megközelítés nem vált be a fenntartás tetemes időigénye miatt. 2006 második felében elkezdtem a molekuláris biológiai vizsgálatokat eleinte Pollák Beatrix biológus közreműködésével. A DNS izolálást minél több sejtből kívántam végezni és ezért csak az A1 klónnal foglalkoztam. A többi tenyésztet a következő tavaszig kipusztult, a legtöbb anélkül, hogy DNS-t tudtam volna izolálni belőle. Mivel közben a szimbionta-vizsgálatokat is elkezdtem, 2007-ben jóval kevesebb tenyésztetet tartottam fenn, viszont sikerrel redukáltam a sejtek számát a DNS izolálásnál. Minthogy több *Arcella* fajnál már 10-20 példányból is sikerült az izolált DNS-t amplifikálni, arra törekedtem, hogy a nehezen tenyésző fajokból legalább ennyit kitenyészek és az izolált DNS-t lefagyasztottam. 2007 őszén ritka és nehezen tenyészthető fajoknál elkezdtem a környezeti mintából egyelt példányokból is DNS-t izolálni. 2008 során ezen meg gondolás értelmében a jó környezeti mintákban talált fajok közül azokat, amelyek egyértelműen azonosíthatók voltak, ezzel a módszerrel dolgoztam fel. Emellett indítottam új klóntenyészteteket is. Arra törekedtem, hogy a laborban legrégebben jelenlévő klóntenyészteteket fenntartsam, ez sikerült is. A tenyésztetek azonban olykor hirtelen pusztultak ki, ennek okait (vírus, baktérium, gomba fertőzés) nem volt még módomb vizsgálni. Mivel a vizsgálati alanyokat a környezetből izoláltam és végig fenntartottam, nem volt szükséges *Arcella* tenyésztetet törzsgyűjteményből, kereskedelmi úton beszerezni.

Tudományos alapvetés

Filogenetika

2005 körül az Amoebozoa törzsnél a molekuláris filogenetikai ismeretek még igen szűkösek voltak. A filogenetikai célra legmegfelelőbb molekuláris markerek kiválasztása sem történt meg. A legtöbb összehasonlító adat a 18S rRNS génről volt, ezért a saját vizsgálataimnál is ezt a gént terveztem megszekvenálni a genus törzsfán történő elhelyezésére és a különböző morfológiai csoportba tartozó fajcsoportok karakterizálására. Az utóbbi néhány évben előtérbe került a molekuláris barcoding témaköre az Amoebozoa körében is, és egyidejűleg a mitokondriális citokróm c oxidáz I alegység (COI) génszekvenciájának használata. A kevés összehasonlító adat miatt azonban jelenlegi célkitűzésemnek ez nem felelt meg. Az *Arcella* fajok intraspecifikus polimorfizmusának tanulmányozására ezért inkább az ITS régiót szándékoztam vizsgálni, amelyet mikrogombáknál és amőbák körében is elterjedten alkalmaznak. Az Amoebozoa és ezen belül a házas amőbák vizsgálata az utóbbi 5 év során a tudományos érdeklődés homlokterébe került. Még mindig nagyon kevés azonban a szekvenciaadatok mennyisége és a vizsgált génszakaszok száma. A többgénés vizsgálatok alkalmazása (pl. Tekle és mtsai 2008) a jövőben számomra is követendő célt jelent. A mostani vizsgálatok azonban egyetlen gén, a 18S rRNS vizsgálatán alapulnak.

Szimbionták

Naegler (1910) figyelt meg először baktériumokkal ferőzött amőbákat, amelyek a gazdát később elpusztították. Később mind amőbákban, mind csillósokban megfigyeltek endobionta baktériumokat, amelyek egy része csupán rezervoárként használta a gazdát, míg mások a tenyésztési körülményektől függően akár patogének lehettek (áttekintő cikkek: pl. Barker és Brown 1994, Horn és Wagner 2004, Greub és Raoult 2004). Napjainkban összefoglaló elnevezéssel amőbában élő baktériumoknak (amoeba-resisting bacteria – ARB) nevezik mindazon prokarióta szervezeteket, amelyek valamilyen okból a sejten belül tartózkodnak és elkerülik az emésztést. Mivel a világszerte végzett vizsgálatokban a gazdaszervezet a

kereskedelmi célú törzstenyészetekben könnyen tartható és onnan beszerezhető gyorsan szaporodó, gyakran (opportunist) patogén csupasz amőbák köréből került ki, a szabadon élő amőbák döntő hányadánál jóformán nincs információ endobionták vonatkozásában. Így a lassabban szaporodó, nehezen tenyészthető csupasz és házas amőbákról (laboratóriumokban tenyésztett *Amoeba proteus* kivételével) sincs endobiontákkal kapcsolatos adat. Mivel utóbbiak minden természetes élőhelyen megtalálhatók, feltétlenül érdemesnek látszott megvizsgálni, vannak-e és milyen endobionta baktériumaik.

A plazmogámia jelentősége

A prokarióta-eukarióta viszonyban történő laterális géntranszferre és annak hatásaira a gazdaszervezet genomjában mind több bizonyíték van (pl. Watkins és Gray 2006, 2008). A baktérium átadás nyilvánvaló vertikális lehetősége mellett (osztódás) a horizontális átadásnak feltételezhetően több módja is lehet amőbákban. A házas amőbáknál (továbbá különféle amöboid szervezeteknél, napállatkáknál és foraminiferáknál) megfigyelhető plazmogámia jelenségét eddig nem tanulmányozták behatóan, de rendszerint a táplálék közös emésztéseként, vagy valamilyen ivaros folyamat jeleként értelmezték (Okada). Figyelemreméltó jelenség volt a plazmogámia rendszeres előfordulása tenyészeteimben, a megfigyelésekről az eredmények között számolok be.

Eredmények

Eredményeim a *Tématervben* foglalt célkitűzések főbb pontjainak megfelelően:

Kísérleti objektumok beszerzése

- ✓ Természetes környezetből izoláltam az *Arcella* (Amoebozoa, Arcellinida) genus fajait tenyésztés céljára. Mivel sikerült saját tenyészeteket létrehoznom, nem volt szükséges törzsgyűjteményből vásárolnom.

Tenyészetek kialakítása és fenntartása

- ✓ Létrehoztam a vizsgálandó egysejtű genus fajaiából nyers és klóntenyészeteket. A legelső már négy és fél éve fennáll. Utóbbiakat törekedtem eukariótákra axenizálni, részleges sikerrel – de kutatásom szempontjából csupán az ITS vizsgálatokat könnyítette volna a valóban axenikus tenyészet, egyelőre specifikus primer híján -, így egyelőre nem fordítottam több gondot a témára. A tenyészetek fenntartása a vártnál munka- és időigényesebb volt.

A tenyészetek morfológiai vizsgálata

- ✓ A morfológiai vizsgálatokhoz rögzítettem mind vegyes mintákat, mind tiszta tenyészetekből származó sejteket. Biometriai vizsgálatot folytattam a ritka fajnak minősülő *Arcella formosa*-n.

Házas amőba klónok genetikai polimorfizmusának vizsgálata

- ✓ A házas amőba klónok genetikai polimorfizmusának vizsgálatát megelőzően parciális 18S rRNS gén szekvenciákat hoztam létre több *Arcella* fajnál. Eredményeim alapján látható, hogy ez a gén alkalmas a genus filogenetikai helyének megállapítására, de - szemben más egysejtű csoportokkal – igen konzervatív, ezért korlátozottan alkalmas az egyes fajok, fajcsoportok elkülönítésére. A jelenlegi szekvencia-szakaszok ismeretében megállapítható, hogy a fajon belüli polimorfizmus tanulmányozására más gént ill. markert kell választani. Az alkalmas markerrel (ITS régió) történő vizsgálat optimalizálása még tart.

Szimbionták kimutatása

- ✓ Szimbionták kimutatása: mind *in situ* (FISH és TEM), mind molekuláris módszerekkel (16S rRNS gén szekvencia) sikerült többféle endobionta baktériumot kimutatnom, egyeseket azonos klóntenyészetből fél vagy két év távlatában, ismételten is. Több baktérium törzset tenyészetben, ill. konzerválva tartok fenn.

Vizsgálatok szimbiontát tartalmazó axenikus tenyészetekkel

- ✓ Vizsgálatok endobiontákkal: A baktériumokat parciális 16S rRNS gén szekvenciák alapján azonosítottam. A fontosabb törzsek egy-egy képviselőjének szekvenciáját elhelyeztem a GenBank adatbázisban. Antibiotikus kezelésnél egyelőre csupán a teljes baktérium közösség kiirtása sikerült, amelyet késéssel a gazdasejtek pusztulása követett. A talált baktériumok között több szimbiontaként ismert genus ill. faj található. Az eddigiek ismeretében még nem jelenthető ki, hogy bármelyik is mutualista viszonyban állna a gazdával. A *Rhizobium* fajnál azonban a vonatkozó vizsgálatok még tartanak. Több (humán) patogén baktériumot is azonosítottam. Ugyanazon *Arcella* faj különböző lokalitásról származó klónjaiban sikerült több azonos baktériumot kimutatnom. A talált baktérium taxonok közül a korábbi szakirodalom többet is megemlít csupasz amőbákból. Ez a témarész a vártnál több és sokrétűbb eredményt adott.

Az eredmények részletes kifejtése

A vizsgálati objektumok

A Magyarországon eddig azonosított 17 *Arcella* faj közül az OTKA kutatás keretében tizenhárommal foglalkoztam valamilyen formában (2. Táblázat). A fennmaradó négy hazai faj közül kettő nagyon ritka (*A. crenulata*: még nem publikált előfordulás, *A. mitrata*: egyszeri észlelés több évtizede), egy gyakoribb (*A. rotundata*) és egy feltételezhetően *nomen nudum* (*A. costata*) (Török 1998). A vizsgált fajok közül az *A. arenaria* nedves mohában és talajban gyakori, de tenyésztési nem sikerült és DNS izolálás sem történt egyelőre. Az *A. catinus* különböző vizes élőhelyeken és főként *Sphagnum*-ban gyakori, egyelével izoláltam példányokat a DNS izoláláshoz, mert tenyésztési nem sikerült. Az *A. conica* nem túl gyakori faj egyetlen mintavételi helyen nagy abundanciával fordult elő, tenyésztése nem sikerült és egyelőre csak morfológiai vizsgálatra rögzített példányi vannak. Az *A. dentata* faj hinaras kisvizekben él, nem gyakori, két különböző élőhelyről is begyűjtöttem, pár hónapig tenyésztési is sikerült. Az *A. discoides* fajt sikerült a legtöbb helyről begyűjteni; nehezen, de egy évig tenyészthető, és bár sok DNS izolálás történt belőle, sikeres amplifikálás viszonylag kevés volt. Az *A. excavata* faj ritka, a Dunából gyűjthető faj, egy alkalommal sikerült befogni és tenyésztési, szekvenciát is eredményezett. Az *A. formosa* nagyon ritka, nemrég leírt faj, amit tenyésztési csak rövid ideig sikerült, a DNS izolálás egyelőre követően történt. Az *A. gibbosa* kisvizekben gyakori faj, tenyésztési nem sikerült, egyeléből származik a DNS minta. Az *A. hemisphaerica* a leggyakoribb az *A. discoides* és *A. intermedia* fajok mellett, viszonylag könnyen tenyészthető, de egy éven belül kipusztul, a legtöbb szekvencia adat belőle származik. Az *A. intermedia* faj a tenyészetben legtovább fennmaradó taxon, amelynek két különböző helyről (Ipoly és Duna) származó klóntenyészet már 4,5 ill. 2,5 éve fennáll. Az Ipolyból izolált vonal (A1) sikeresen amplifikálható, míg a Dunából izolált másik azonban nem. Az *A. megastoma* faj rendszeresen előfordul hinaras kisvizek metafitonjában, de nem tenyészthető, egyelt mintákból izoláltam DNS-t amit eddig nem sikerült amplifikálni. Az *A. polypora* fajból egyszer egyelével sikerült DNS-t kinyerni. Az *A. rotundata* faj nem fordult

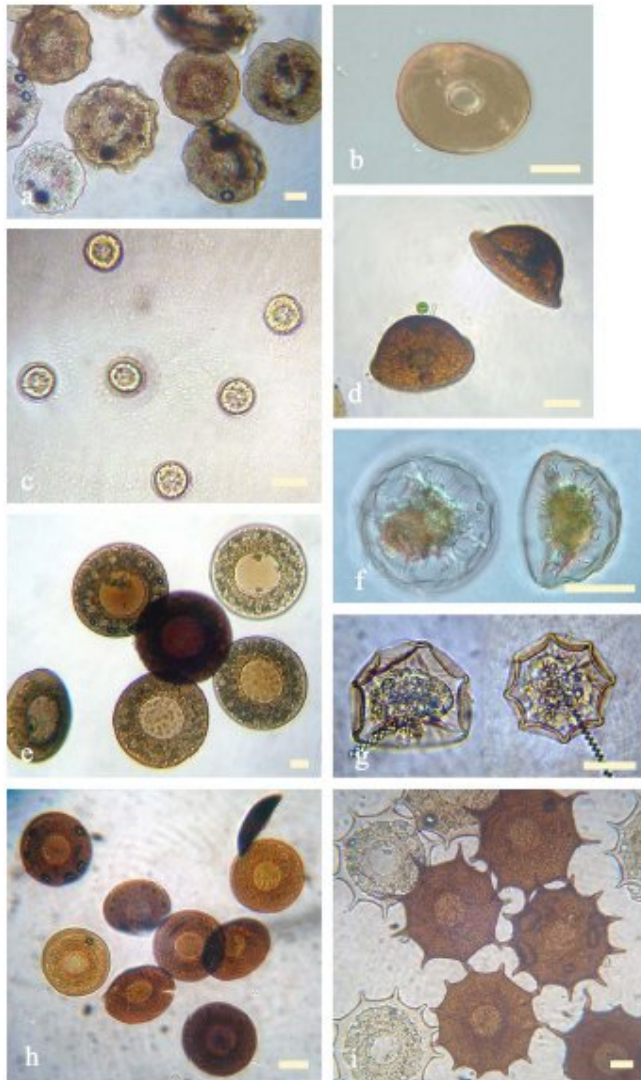
elő a minták között, de az első *A. intermedia* klón téves azonosítása miatt több publikációban ezen a néven szerepelt, ezeket *A. intermedia* 1-ként jelölöm. Az *A. vulgaris* rendszeresen előfordul hinaras kisvizekben. Nehezen tenyésztethető, az izolált DNS egyeléből származik.

A Magyarországon valaha azonosított <i>Arcella</i> fajok	Vizsgálat alatt előkerült	Tartósított minta	Lelőhelyek száma	Tenyészet	DNS Minta	DNS-minta leelőhelyek száma	Szekvencia	FISH	TEM	Baktérium tenyésztés
<i>Arcella arenaria</i> Greeff, 1886	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcella catinus</i> Penard, 1890	+	**	1	-	1	1	-	-	-	-
<i>Arcella conica</i> Deflandre, 1928	+	**	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcella costata</i> Ehrenberg, 1847	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcella crenulata</i> (Deflandre, 1928)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcella dentata</i> Ehrenberg, 1830	+	3	2	+	3	2	+	+	-	-
<i>Arcella discoides</i> Ehrenberg, 1872	+	8	6	+	10	8	+	+	-	+
<i>Arcella excavata</i> Cunningham, 1919	+	1	1	+	2***	1	+	+	-	-
<i>Arcella formosa</i> Nicholls, Meisterfeld & Török, 2005	+	3	1	+	4	1	+	+	+	-
<i>Arcella gibbosa</i> Penard, 1890	+	**	3	-	3	2	+	-	-	-
<i>Arcella hemisphaerica</i> Perty, 1852	+	7	3	+	6	5	+	-	-	-
<i>Arcella intermedia</i> (Deflandre, 1928)	+	8	4	+	11	2	+	+	+	+
<i>Arcella megastoma</i> Penard, 1902	+	**	1	-	6	5	-	+	-	-
<i>Arcella mitrata</i> Leidy, 1879	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcella polypora</i> Penard, 1890	+	1	1	-	1	1	-	-	-	-
<i>Arcella rotundata</i> Playfair, 1918	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arcella vulgaris</i> Ehrenberg, 1832	+	1	1	-	3	3	-	-	-	-

2. Táblázat. Az *Arcella* genus Magyarországon kimutatott fajai a különféle vizsgálatokban történő részvétel megjelölésével. *: a 2008-as cikkben *A. rotundata*ként szereplő faj *A. intermedia*. **: vegyes rögzített minta. *** tisztított amplikon.

Tenyészetek kialakítása és fenntartása

A szakirodalomban nincsenek részletes leírások házas amőbák tenyésztésével kapcsolatban. A kollégáktól kapott tanácsok mellett nekem kellett kidolgoznom a megfelelő eljárásokat, ezért ezeket is ismertetem. A természetben gyűjtött mintákat laborban átvizsgáltam, hogy van-e bennük élő *Arcella*. A talált Arcellákból minél több példányt mikropipettával kiemeltem a vízből és ásványvízzel telt petricsészébe helyeztem. A példányok közül egyet kiemelve vízcsepp soron átmostam és tiszta ásványvízbe helyeztem, tenyésztőlemezre vagy petricsészébe. A tenyésztési körülmények kialakítását követően táplálékként CASO levesben felszuszpendált *Enterobacter aerogenes*t kaptak, élőt, vagy 70°C-on elöltet. A tenyészfolyadék hozzávetőleges összetétele a következő volt 35mm átmérőjű petricsészénél: kb 5 ml ásványvízhez 1µl baktérium szuszpenziót adtam. Ez a mennyiség tapasztalati úton alakult ki, több táplálék esetén nagyon hamar túlszaporodtak a különféle mikroszervezetek. Az ásványvíz kiválasztásánál szempont volt az alacsony hidrokarbonát és ásványianyag tartalom.



1. ábra. Válogatás a vizsgálatban szereplő *Arcella* fajokból. a) *Arcella formosa*, b) *A. catinus*, c) *A. hemisphaerica*, d) *A. vulgaris*, e) *A. megastoma*, f) *A. gibbosa*, g) *A. conica*, h) *A. discoides*, i) *A. dentata*

	összes oldott ásványianyag	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	hidrokarbonát
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Danone Vitalinea - forrásvíz	225,9	4,0	45,6	4,2	146,5
Nestlé Vera	160	2,0	35,9	12,6	3,5

3. Táblázat. A tenyésztéshez használt ásványvizek legfontosabb ásványi komponensei.

A tápoldat mind szerves- mind ásványi anyagokban szegény volt. Ellenkező esetben, például vitamin ill. nyomelem hozzáadása alkalmával a gombák túlszaporodtak és az amőbák elpusztultak.

Eukariótákra kvázi axenikus környezetet igyekeztem létrehozni. Ez a fáradozás csak részleges eredményre vezetett, mert a magárahagyott és zárt petricsészében idővel mindig megjelentek eukarióták. A pár hete, hónapja fennálló klónokban inkább Heterokonta ostorosok voltak feltűnőek, a többéves tenyészetekben molekulárisan még nem, csak morfológiailag azonosított mikrombák voltak stabilan jelen. A vizsgálatok jelen fázisáig csak próbaképpen használtam antibiotikum-antimikotikum készítményt a szennyező szervezetek irtására. A javasolt koncentráció a gombákat nem irtotta ki, a baktériumokat azonban igen, és az Arcellák is elpusztultak 1-6 nap alatt, elképzelhető, hogy a baktériumtáplálék hiánya és a gombák túlszaporodása miatt.

Az Arcellák gyűjtésére az áprilistól októberig terjedő időszak volt a legalkalmasabb, ezen kívül csak alkalmilag sikerült néhány bevált mintavételi helyről élő példányokhoz jutni.

Minden alkalmas habitat típusból próbáltam *Arcella* fajokat izolálni: talajból, tőzegmohából, áramlóvízből és állóvizekből. A leghatékonyabbnak a mezotróf kisvizek bizonyultak, ahonnan egyidejűleg akár 4-5 faj is előkerült. Mivel eredeti célkitűzésem szerint az intraspecifikus polimorfizmust kívántam vizsgálni, igyekeztem az ország minél több, egymástól távoli pontjáról mintákat szerezni. Változó eredményességgel sikerült bennük Arcellát találni ill. a mintákat felhasználni.

Morfológiai vizsgálatok

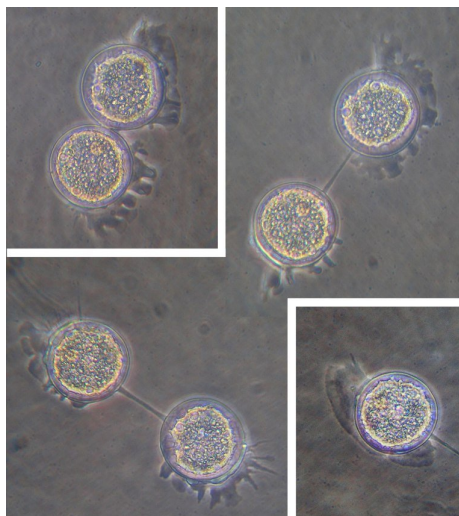
Plazmogámia

A sikeres klóntenyészeteknél (amelyek legalább fél éven át túléltek) kb. fél évet követően semmilyen körülmények között nem lehetett cisztaképzést megfigyelni (Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy endobionta prokarióták hatására amőbában a cisztaképzésre való képesség gyengüléséről számoltak be (in: Greub 2004)). A klóntenyészetben szaporodni nem hajlandó törzsek viszont hamar cisztát képeztek és kipusztultak. A klóntenyészeteknél megfigyelt igen feltűnő jellegzetesség a plazmogámia volt, amelynek során két vagy több egyed vékony állással összeköttetésben állt egymással. Erős fény hatására az egyedek szétváltak, különben percek alatt fennállt. Plazmogámiát többnyire új petricsészébe történő áthelyezést követően, jó állapotban levő tenyészetnél lehetett megfigyelni (2. ábra). A két vagy több egyed között kialakuló vékony plazmahidak jelentőségét abban látom, hogy lehetővé teszik az összeköttetésben álló citoplazmákban található baktériumok, vírusok és akár más, mobilis genetikai elemek cseréjét. Bár a plazmogámiát a jelenség-szinten túl egyelőre nem vizsgáltam, további kutatása feltétlenül indokolt, mert a legkézenfekvőbb lehetőséget rejti horizontális géntranszfer (HGT) megvalósulása számára amely egyre inkább a figyelem középpontjába kerül az aszexuális élőlények, így akár a házas amőbák vonatkozásában is. A HGT eredményességére mind kísérletes, mind környezeti példák ismeretesek. Növényeken végzett kísérletben például *Agrobacterium* faj tumor indukáló plazmidja (Ti-plazmid) épült be a növény nukleáris DNS-ébe (Bock 2010). Kísérletek

tanúsága szerint a *Rhizobium* fajok is képesek megfelelő plazmid birtokában horizontális géntranszfert létrehozni, márpedig utóbbiak nálam is előkerültek az endocitobionták kimutatása során. Van példa adaptívnek bizonyuló HGT-re alga és baktérium között: bakteriális ferritin beépülését mutatták ki tengeri kovaalgafajnál. (Bock 2010).

Ezek alapján feltételezhető, hogy az eddigi ismeretek szerint kizárólag aszexuálisan szaporodó *Arcella* trofozoitáknál is előfordulhat HGT. A pályázat eredményeként a klóntenyészeteken megfigyelt plazmogámia és az endocitobionta baktériumok detektálása tehát fontos kiindulópontja a további kísérletes vizsgálatoknak.

Kapcsolódó publikáció: absztrakt 4 és 6. (plazmogámia bemutatása)

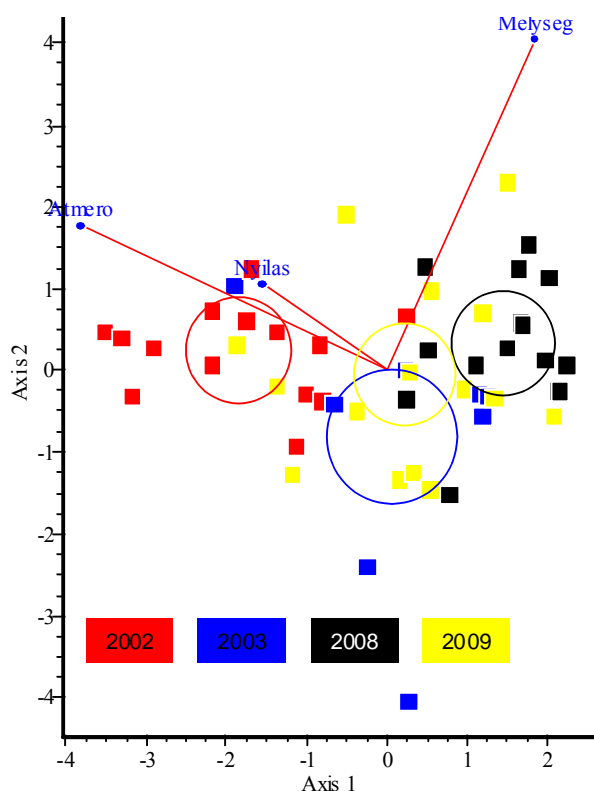


2. ábra. Plazmogámia klóntenyészetben tartott *Arcella intermedia* egyedek között.

Az *Arcella formosa* Nicholls, Meisterfeld, Török, 2005 biometriai vizsgálata

Az *Arcella formosa* Nicholls, Meisterfeld & Török, 2005 azon kevés házas amőba faj egyike, amely igen feltűnő módon különbözik mind méretre, mind alakra a genus többi fajától, átmeneti formák gyakorlatilag nincsenek. Eddigi ismeretek szerint csupán Hollandia, Németország, Magyarország és Kanada egy-egy pontján fordul elő, holott ezen területeken folytak a legintenzívebb vizsgálatok az utóbbi 150 évben. Élő példányok rendszeres tanulmányozására egyedül a hazai biztos lelőhely ad módot, a holland és kanadai előfordulás csak üres vázak alapján igazolható. A nagy földrajzi távolság miatt az ócsai állomány teljesen izoláltnak tekinthető a faj többi populációjától. Ez alapján feltételezhető, hogy bármely változás kizárólag a helyi génállományban bekövetkező módosulások eredménye, migráció gyakorlatilag nincs. A házas amőbák körében az azonosítás egyik fő támpontja az egysejtűre jellemző mérettartomány ismerete. A méret alakulása tenyészetem megfigyelése alapján függ attól, hogy mekkora a klónt elindító sejt és a továbbiakban milyen hatások érik azt (táplálék, paraziták, vírusok). Nem ismert, hogy milyen mértékű méretbeli fluktuáció lehetséges, és a genom milyen mértékben befolyásolja azt, ill. mekkora a környezeti hatások jelentősége. A korábbi, 2002-es és 2003-as biometriai vizsgálatokat 2008 és 2009 folyamán kiegészítettem újabb adatokkal, környezeti mintákból válogatott egyedek lemérése útján. A diszkriminancia elemzés (SynTax, Podani 2000) alapján a váznak az egyes években mért morfológiai adatai, csak csekély mértékű különbséget mutattak. Az átmérő, alacsony, de szignifikáns eltérést

mutatott egyes évek (2002 és a többi, 2003-2008, 2008-2009) vonatkozásában (3. ábra). A más populációkkal nem érintkező állomány vázmérete mindenképpen a helyi (genetikai vagy a külső környezeti) hatásokra változik. Más *Arcella* fajoknál a méret fluktuációjához a közeli élőhelyekről történő immigráció is jelentősen hozzájárulhat. Az *A. formosa* földrajzilag izolált természetes populációja a házas amőbák körében egyedüli lehetőséget kínál a fajon belüli genetikai polimorfizmus feltárására. A tárolt DNS minták alapján ITS vizsgálattal szeretném az esetleges intraspecifikus polimorfizmust kimutatni. Az ITS vizsgálat optimalizálása azonban még tart, az univerzális primerek ui. a mintában (sejten belül) jelenlevő gombafertőzést is amplifikálják. A specifikus ITS primer kifejlesztése még nem történt meg.



3. ábra. *Arcella formosa* házak morfológiai adatainak ordinációja (diszkriminancia analízis, Syn-Tax) négy különböző évben felvett adatok alapján (változók: Átmérő, Mélység, Nyílás)

Kapcsolódó publikáció: absztrakt 2. (*Arcella formosa* morfológiai adatokon végzett diszkriminancia analízis bemutatása)

Egyéb morfológiai és morfológiai vizsgálatok

7 további *Arcella* faj mintáit rögzítettem további morfológiai vizsgálatok céljára (3. Táblázat), négy másik pedig vegyes rögzített mintából vizsgálható. A morfológiai vizsgálatok elvégzését a molekuláris munkák utánra soroltam át, mivel a molekuláris eredményeket szeretném előbb publikálni.

Fényképes dokumentáció készült az Arcellák mellett a baktérium tenyészetekről és egyes Arcellából kitenyésztett gombatelepekről.

Az *Arcella* genus molekuláris filogenetikai vizsgálata

Az intraspecifikus polimorfizmus vizsgálatát megelőzően a genust szándékoztam a 18S rRNS gén szekvencia alapján a törzsfán elhelyezni, majd a vizsgálatban résztvevő *Arcella* fajok hasonlóságát vizsgálni ugyanezen marker alapján. 2005 és 2009 között 11 *Arcella* fajból 60 DNS izolátumot készítettem, ebből 49-et -20°C-on jelenleg is tárolok, a többit a munkák során felhasználtam. Bár a DNS izolálás anyag- és időigényes, a teljes genomialis DNS tárolása lehetővé teszi a későbbi tetszőleges felhasználást. Emellett néhány alkalommal *single cell pcr* módszerrel is próbálkoztam, ennek optimalizálása még tart. A hőprofil Nikolaev és mtsai (2005) nyomán kezdtem különböző módosításokkal alakítani. Elsőként a s12F - sBR univerzális primerpárt használtam, de a kontroll elektroforézis során két csíkot eredményezett, ezért másokat is kipróbáltam, végül saját primerek tervezését kezdtem el publikált Lobosea szekvenciák alapján a Primer3 program segítségével, amelyeket univerzális primerekkel és más eukariótáknál működő primerekkel (Waeschenbach és mtsai 2007) együtt is használtam.

A genus helye az Amoebozoa törzsfán

A 18S rRNS gén megszekvenálása az első 90 bázis kivételével megtörtént, 1694bp hosszúságú. A Smirnov és mtsai (2005) cikke nyomán a GenBank adatbázisból letöltött referencia szekvenciák segítségével általam készített törzsfákon az *Arcella* szekvencia az Amoebozoa törzs Lobosa altörzs Tubulina csoportjában található. Bármely algoritmus használatával ez a csoportosítás alakult ki.

A választott algoritmus és szubsztitúciós modell szerint azonban a genus pozíciója finom különbséget mutat, amennyiben vagy a házas amőbák között vagy az *Amoeba* – *Chaos* – *Hartmannella* kládon belül csoportosul. A távolságalapú neighbour joining módszer alkalmazásakor az *Arcella* genus a többi Arcellinida között található az *Argynnia dentistoma* házas amőba faj mellett (neighbour joining, maximum composite likelihood, MEGA 4.0 (Saitou és Nei 1985)). Az eukarióta törzsfák kialakításánál azonban jelenleg a maximum likelihood algoritmus használata elfogadottabb, elsősorban a GTR (general time reversible) szubsztitúciós modell használatával. Az így létrehozott törzsfán az *Arcella* a csupasz amőbák *Amoeba* – *Chaos* – *Hartmannella* kládján belül található a házas *Argynnia dentistoma* fajjal együtt (TREEFINDER, Jobb 2008) 4. ábra.

A vizsgált *Arcella* fajok parciális 18S rRNS szekvenciáinak hasonlósága

Öt *Arcella* faj (*A. dentata*, *A. excavata*, *A. formosa*, *A. hemisphaerica*, *A. intermedia*) parciális szekvenciáit sikerült összehasonlítanom (az *A. gibbosa* szekvencia nagyon gyenge, az *A. discoides* pedig csak a gén első kb. 300 bázisára van kész). A 742 illetett pozíció közül 124-nél eltérés volt tapasztalható, amely az *A. dentata* és *A. excavata* fajoknál részben a szekvenciák gyengébb minősége miatt adódott, míg az *A. formosa* szekvenciában kapott szubsztitúciók zöme az ismételt szekvenálási eredmények ismeretében a faji eltérésnek köszönhető (5. ábra).

Az *Arcella excavata* – *hemisphaerica* – *intermedia* csoportban már csak 28 szubsztitúció van, ez a három taxon morfológiailag is erősen közel áll egymáshoz.

A sejtparazita csúcshuzeres spórás *Eimeria* fajok között a 18S rRNS gén vizsgálatakor a gazdaszervezetek nagyobb rendszertani csoportjainak szintjén jelentős különbségek adódtak. Ennél a csoportnál tehát ez a gén alkalmasnak bizonyult a fajok elkülönítésére is. Házas

amőbák köréből származó eredmények alapján nem értékelhető egyértelműen a gén fajok elkülönítésre való alkalmassága, mert az eddig legtöbb adatot nyújtó Hyalospheniidae családban kapott eredmények ellentmondásosak (Lara és mtsai 2008). A szabadon élő *Arcella* fajok között a vázmorfológia alapján kirajzolódó fenológiai csoportok molekuláris megfelelésére számítottam. Az eltérő morfológiai csoportok (Deflandre 1928) azonban *Arcella*knál nem válnak szét határozottan a 18S rRNS gén alapján. Az *A. formosa* mutatja a legnagyobb különbséget a többihez képest, ám morfológiailag az *A. hemisphaerica* – *intermedia* csoporthoz áll közel.

Kapcsolódó publikáció: absztrakt 2. és 4. (az *Arcella* genus molekuláris filogenetikai vizsgálatáról)

ITS régió vizsgálata *Arcella* fajok intraspecifikus polimorfizmusának kimutatására

Az ITS régió vizsgálatára először egy univerzális primerpárt alkalmaztam. Ennek használata azonban vagy nem adott eredményt vagy gyenge minőségű, feltehetőleg kevert szekvenciát eredményezett. A későbbiekben egy csupasz amőbákra kidolgozott primer párral próbálkoztam, de a PCR reakció optimalizálása még tart. Tervezem olyan specifikus primerek kidolgozását, amelyek gomba szennyeződést nem hoznak fel.

Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatok *Arcella* fajok ultrastruktúrájának megismerésére és endocitobionták lokalizálására

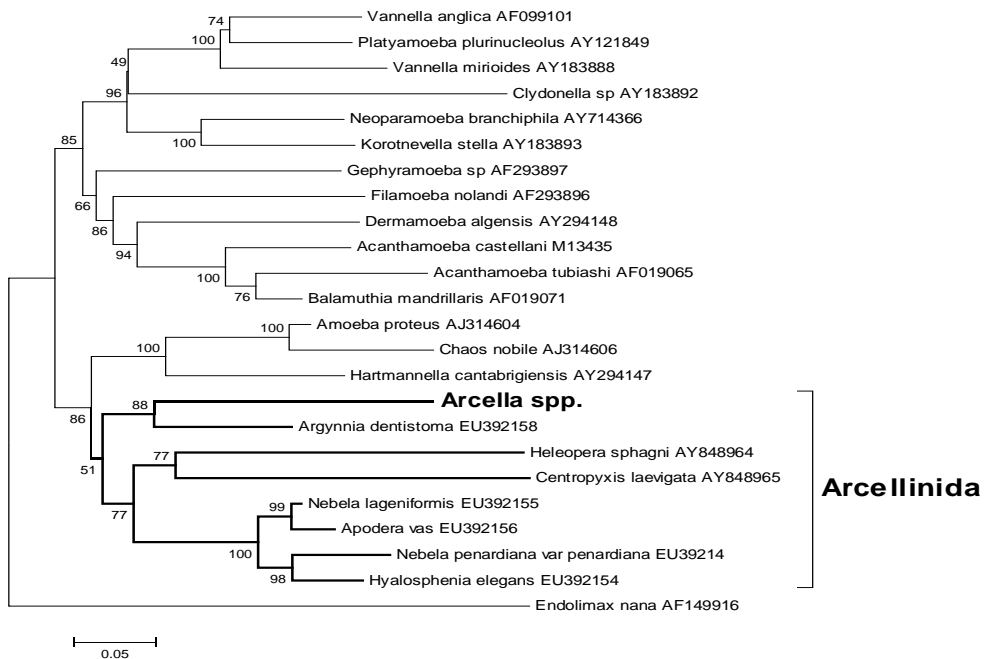
2007-09 során transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk *Arcella* sejteken. Több korábbi ultrastrukturális vizsgálat során már feltárták az *Arcella* genus citomorfológiai jellemzőit (pl. Netzel, 1975). A saját vizsgálataim során a genera jellemző thecagen granulomok mellett a ház szerkezete, a sejtet a házhoz rögzítő epipodiumok, a sejtmagok és a különféle organelumok jól látszottak a felvételeken. A citoplazmában azonban az univerzális sejtalkotók között megfigyelhetők voltak megközelítőleg 1µm méretű baktériumsejtek, amelyek nem emésztővacuolában, hanem a citoplazmában helyezkedtek el. Az emésztőüröcske ultrastrukturális képe jellegzetesen másként nézett ki mint a – képek tanúsága szerint membránvacuola nélkül, szabadon a citoplazmában elhelyezkedő – baktériumoké.

A baktériumok között rövidpálca formák jelenléte volt megfigyelhető. Baktériumok mellett rendszeresen láthatók voltak közelítőleg 100-150nm olykor 300nm méretű parakristályos formák, amelyek feltehetőleg vírusok. Vírusok között a feltűnően nagy Mimivírusokról éppen amőbákban számoltak be Greub és mtsai (2004). Más kutatók korábbi házas amőbás TEM felvételein eddig nem jelentek meg hasonló képletek.

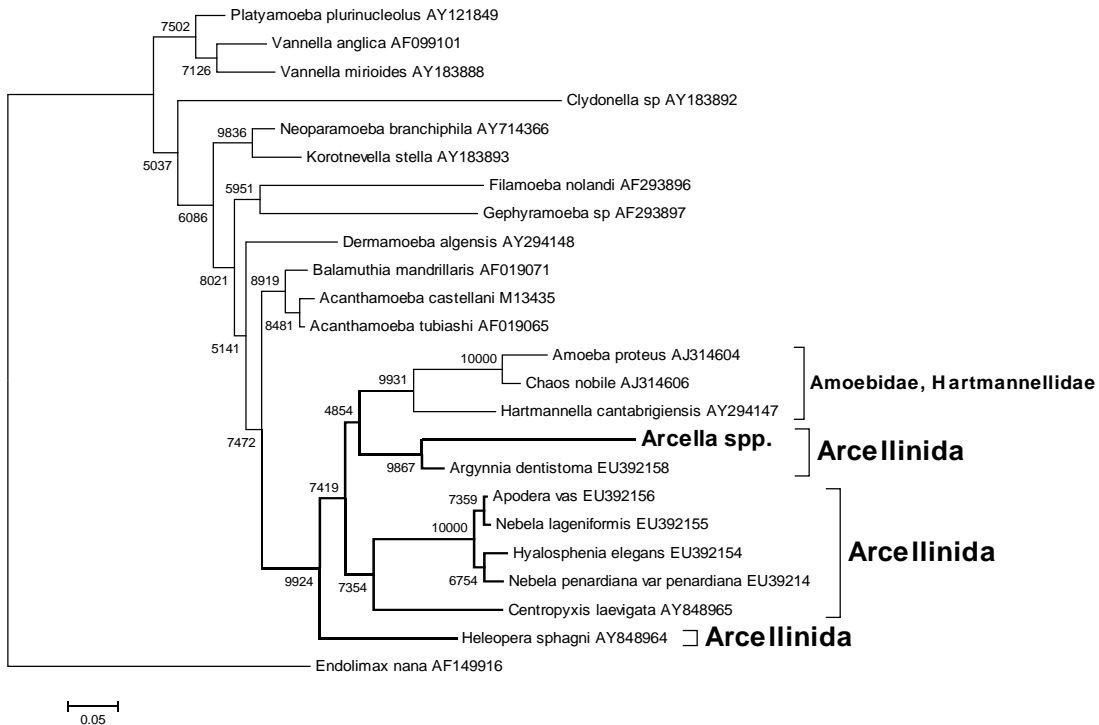
Eukarióta endobiontát a vizsgált sejtekben nem észleltünk. Egy alkalommal az emésztőüröcskében bukkant fel élesztősejt.

TEM vizsgálatokra több *Arcella* fajból is előkészítettünk példányokat, közülük eddig két fajnál (*A. intermedia_1* és *A. formosa*) sikerült a preparálást végigvinni és a mintákat megnézni. Az *A. intermedia_1* fajnál minden alkalommal láthatók voltak az endobionták, a baktérium sejtek épnek látszottak, még osztódó alak is előkerült. Az *A. formosa* fajnál ellenben csupán emésztőüröcskében lokalizált táplálékszervezeteket láttunk. Az endobionták feltételezett hiányát egy másik egyednél negatív eredményt nyújtó *in situ* hibridizációs vizsgálat is alátámasztotta.

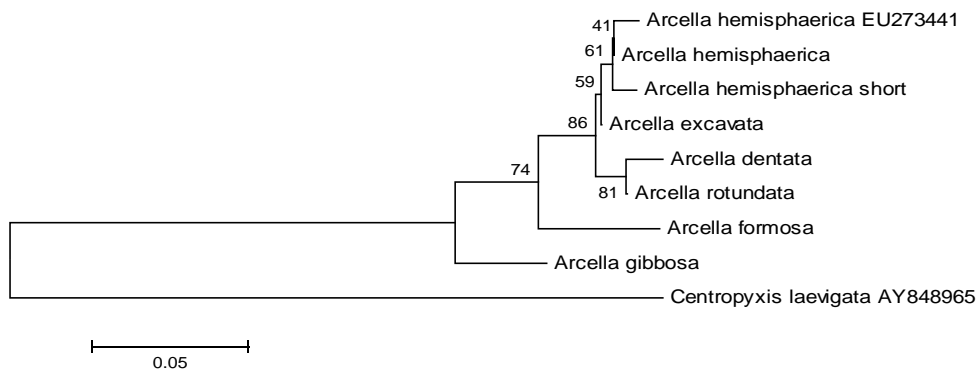
Kapcsolódó publikáció: cikk 1, absztrakt: 2, 5, 6.



4. ábra a). Az *Arcella* genus pozíciója a Lobosa törzsfán (neighbour joining, maximum composite likelihood, a csomópontoknál a bootstrap értékek feltüntetve, 1000 ismétlés, outgroup: *Endolimax nana*, 3009 pozíció, skála: 5% disszimilitás, MEGA 4.0)



4. ábra b). Az *Arcella* genus pozíciója a Lobosa törzsfán (maximum likelihood, GTR modell, a csomópontoknál a valószínűség értékek vannak feltüntetve, a második számjegyet követő tizedesvessző technikai okokból hiányzik, outgroup: *Endolimax nana*, 663 pozíció, skála: 5% disszimilitás, elemzés: TREEFINDER, törzsfá: MEGA)



5. ábra. Az *Arcella* fajok hasonlósága parciális 18S rRNS gén hasonlósága alapján (neighbour joining, maximum composite likelihood, a csomópontoknál a bootstrap értékek feltüntetve, 1000 ismétlés, pozíció, skála: 5% dissimilaritás, MEGA)

Fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatok endobionta baktériumok kimutatására és lokalizálására

A FISH vizsgálatok során összesen hétféle különböző jelölést alkalmaztam. Leggyakrabban az eubaktériumokra tervezett oligonukleotidot használtam, hogy lássam, van-e egyáltalán endobionta baktérium a gazdasejtben. Ehhez a legjobb minőségű ALEXA 546 jelölést választottam, tekintve, hogy nagyon hosszú időn keresztül bírja a gerjesztést. A második legtöbbet alkalmazott próba Alphaproteobacteria specifikus volt, mert ebből a csoportból a szakirodalom nyomán kimontottan vártam endobionták előfordulását. A korábbi tenyésztéses vizsgálatok alapján ésszerűnek tűnt más baktériumcsoportok bevonása a FISH vizsgálatok körébe. Így került sor a Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes és Verrucomicrobiales csoportok alkalmi bevonására is. A tenyészetekből hosszútávon kiirthatatlan eukarióták között feltételezhető volt élesztők jelenléte is, emiatt próbálkoztam ezek kimutatásával is.

Az *Arcella intermedia* 1-nél 6 különböző FISH-t végeztem. Általános eubaktérium vizsgálatok 2007. során február, április és június hónapokban történtek. 2008 során feltehetőleg sikertelen reakció miatt negatív eredményt kaptam. Specifikus próbákkal 2007. júniusban és 2009. augusztusban Alphaproteobacteria csoportot mutattam ki. 2007 júniusban Firmicutes-re kaptam pozitív jeleket. Negatív eredményt adott a Verrucomicrobia, Gammaproteobacteria csoportok mellett a tenyésztőedényben feltételezhetően jelenlevő élesztő-próba is.

Az *A. intermedia* 2-nél 2007. júliusban Alphaproteobacteria, 2008. októberben és 2009. augusztusban eubaktériumok kimutatására került sor. Egy további alkalommal halvány jel utalt alfaproteobaktériumokra, máskor pedig egyáltalán nem adott jelet ez a próba. Sikertelen preparálás okozhatott két esetben a fenti próbáknál negatív eredményt. Az élesztő ennél a törzsnél sem adott jelet.

Általános eubaktérium vizsgálat pozitív eredményt adott az *Arcella excavata*, *A. dentata* és *A. megastoma* fajok egy-egy példányánál, utóbbinál a vizsgálati körülmények (másik mikroszkóp használata) valószínűleg rontottak az eredményen.

Az *Arcella polypora*-ban Firmicutes baktériumokat sikerült kimutatni. Az *A. discoides*nél alfaproteobaktérium jelöléssel kapott szignálok feltehetően a táplálékszervezetekben vagy emésztőüröcskében lokalizált baktériumok lehettek. Az *A. formosa*-nál az eubaktérium szignál egyáltalán nem jelent meg, az alfaproteobaktérium gyenge jelet adott.

Összesen 7 *Arcella* fajnál 29 vizsgálat történt, 41 sejt közül 25 adott jelet, ebből 16 általános eubaktérium volt, 7 Alphaproteobacteria és 2 Firmicutes. A pozitív jelek zöme a klóntenyészetben tartott *A. intermedia* 1. és 2. törzseknél volt tapasztalható (26 sejt). Az 1. törzsnél két és fél, az *A. intermedia* 2. törzsnél két év távlatában kaptam pozitív eredményeket. A rövid ideje, közelítőleg 6-8 hete tenyésztett *A. polypora*, *A. excavata* és *A. dentata* fajok is pozitív eredményt adtak. A friss környezeti mintából izolált *A. formosa* és *A. megastoma* nem, ill. csupán kétes, alig észlelhető szignálokat adott. E két faj azonban egyidejűleg a legnagyobb átmérőjű és vertikális kiterjedésű, ahol a gazdasejt mérete erősen csökkenthette a megfigyelés eredményességét (a hibridizáció során rosszabb hatásfokú penetráció, hagyományos mikroszkóppal mélységélességbeli problémák). A hasonló mérettartományba tartozó *A. dentata* példány lapítottabb sejtje ideálisabb volt a vizsgálathoz, ráadásul konfokális lézermikroszkóppal, optikai szeletek mentén történt a megfigyelés. Ezért, és a vizsgálatok egyedi volta miatt nem jelenthető ki egyértelműen, hogy a vizsgált *A. formosa* és *A. megastoma* fajoknál ne fordultak volna elő endobionta baktériumok.

Konfokális lézermikroszkóp használatára két alkalommal, három fajnál volt alkalmam. Az *A. intermedia* 2-nél és az *A. dentata*-nál eubaktériumok, az *A. intermedia* 1-nél alfaproteobaktériumok sejten belüli lokalizációját figyeltem meg. Kimutattam, hogy a baktériumok a sejt teljes térfogatában előfordulnak, preferenciális elrendeződés nem volt tapasztalható.

A tenyésztett egyedek homogén környezetben vannak a környezetből frissen izoláltakhoz viszonyítva. A tápfolyadék tápanyagban szegény, a sejt belseje azonban ennél gazdagabb. Feltételezhető, hogy a baktériumok számára előnyösebb a sejten belül elszaporodni, mint a tápfolyadékban.

Kapcsolódó publikáció: cikk 1, absztrakt: 2, 3, 5, 6.

Endobionta baktériumok kimutatása molekuláris módszerekkel

A sterilen mosott *Arcella* példányokból agaron (módosított R2 agar) kitenyésztett baktériumokat szélesztettük, izoláltuk, tiszta tenyészetekben növesztettük, majd DNS izolálást követően a 16S rRNS gént amplifikáltuk, ezt követően a gén 27-519 bp szakaszát megszekvenáltattuk (a módszer részletes leírását l. Török és mtsai 2008 cikkben). A pályázati munka során ezzel a módszerrel 14 különböző baktérium faj ill. genus azonosítására került sor, amelyek egy része ismétlődően előkerült a vizsgált fajokból.

Összesen 40 szekvencia azonosítására került sor szekvenáltatással, ebből 29-re a cikk megjelenését követően. A törzsek tipizálására ezen felül egy költséghatékony eljárást fejlesztettünk ki. A kezdetben alkalmazott ARDRA csoportosítást egy TP-RAPD (two primers random amplified polymorphic DNA) eljárással váltottuk fel (Rivas és mtsai 2001, Lin és mtsai 2008), kimondottan a drága restrikciós enzimek használatának elkerülése végett. A 20 bp hosszú, nagy százalékban GC bázispárokat tartalmazó reverz primer (NS3) az univerzális 27F primerrel alacsony anellációs hőmérséklet mellett alkalmazva a különböző törzsekre jellemző RAPD-profil adott.

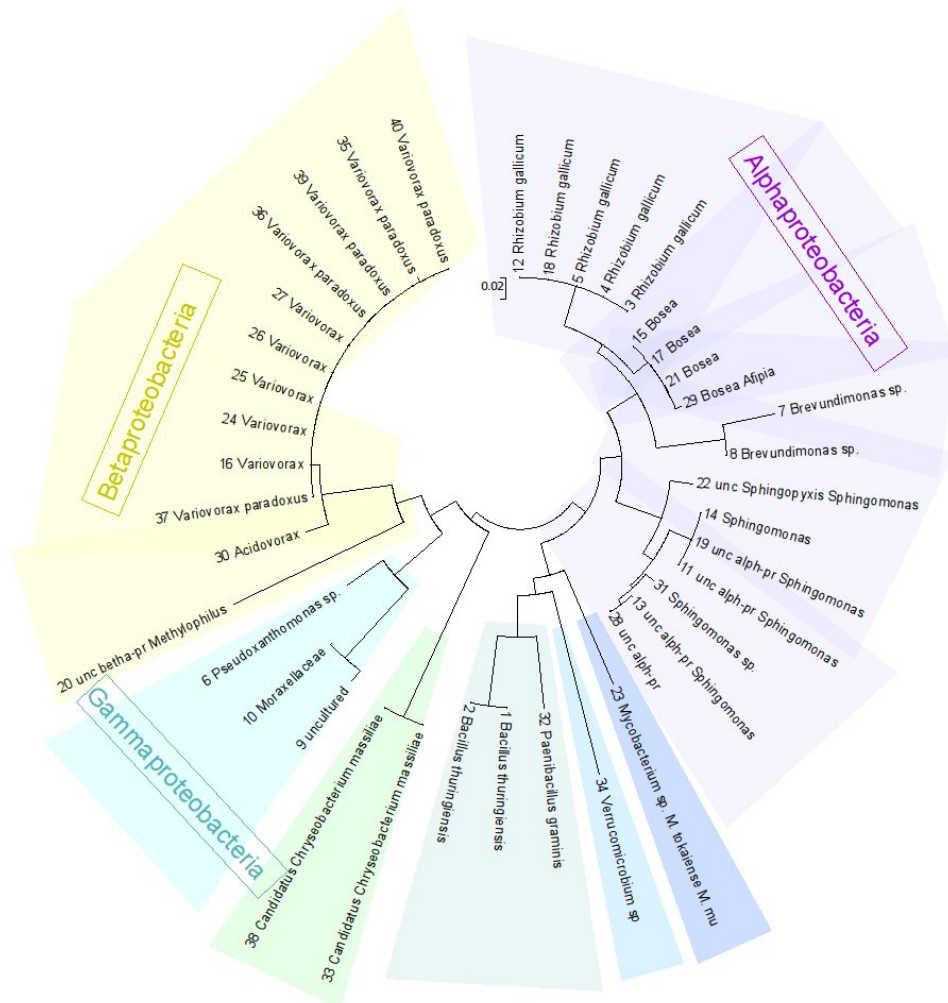
A törzsek egy része DMSO tartalmú oldatban fagyasztva lett eltárolva, egy másik részét tenyészetben tartjuk további vizsgálatok céljára.

baktérium	szekvencia hossza	gazda	Genbank azonosító
<i>Bacillus cereus</i>	511 bp	<i>Arcella intermedia</i>	FN667584
<i>Rhizobium gallicum</i>	449 bp	<i>Arcella intermedia</i>	FN667585
<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	509 bp	<i>Arcella intermedia</i>	FN667586
<i>Sphingomonas sp.</i>	446 bp	<i>Arcella intermedia</i>	FN667591
<i>Sphingomonas sp.</i>	445 bp	<i>Arcella intermedia</i>	FN667592
<i>Sphingomonas sp.</i>	422 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903096
<i>Bosea sp.</i>	452 bp	<i>Arcella intermedia</i>	FN667594
<i>Acidovorax sp.</i>	467 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903095
<i>Paenibacillus graminis</i>	491 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903093
<i>candidatus Chryseobacterium massiliae</i>	480 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903098
<i>candidatus Chryseobacterium massiliae</i>	399 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903097
<i>Verrucomicrobium sp.</i>	511 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903094
<i>Variovorax paradoxus</i>	384 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903099
<i>Variovorax paradoxus</i>	770 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903100
<i>Variovorax paradoxus</i>	748 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903101
<i>Variovorax paradoxus</i>	742 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903102
<i>Variovorax paradoxus</i>	790 bp	<i>Arcella intermedia</i>	AM903103
<i>Brevundimonas sp.</i>	452 bp	<i>Arcella intermedia</i> 2.	FN667587
<i>Moraxella sp.</i>	494 bp	<i>Arcella intermedia</i> 2.	FN667589
<i>Mycobacterium sp.</i>	478 bp	<i>Arcella intermedia</i> 2.	FN667589
<i>Sphingopyxis sp.</i>	446 bp	<i>Arcella intermedia</i> 2.	FN667593
<i>Variovorax paradoxus</i>	505 bp	<i>Arcella discoides</i>	FN667590

4. táblázat. A Genbank nemzetközi adatbázisban elhelyezett baktérium szekvenciák és azonosítójuk a gazdaszervezet feltűntetésével.

Egyetlen alkalommal sem tenyésztett ki Arcellából az etetésre használt *Enterobacter aerogenes*. A baktériumtörzsek legnagyobb hányada a Proteobacteria phylumból került ki, azon belül is az Alphaproteobacteria osztályból (6. ábra). Ezen baktériumok között számos szimbionta és endobionta van. A kapott szekvenciák között az ismert szimbionta genusból a *Rhizobium gallicum* faj is szerepel. A közeli rokon és szimbionta fajt is magában foglaló *Bosea* genus csak 1996 óta ismert, a vizsgálataim során két különböző *Arcella* fajból (*A. intermedia* 1 és 2. törzs, *A. discoides*) is előkerült. A Moraxellaceae csoportba több patogén faj tartozik. A *Brevundimonas* és *Sphingomonas* genusok egyes fajai potenciális patogének, tehát hajlamosak lehetnek endobionta életmódra. A Firmicutes törzsbe tartozó *Paenibacillus* fajok között ismert endobionta. A *Bacillus cereus* humán vonatkozásban is jelentős kórokozó faj.

A Verrucomicrobia törzsbe tartozó *Verrucomicrobium* fajok között protozoonok szimbiontái ismertek. A Bacteroidetes törzsbe tartozó *candidatus Chryseobacter massiliae*-t opportunistá patogén amőbából izolálták. Az azonosított gyors növekedésű *Mycobacterium*-ról endobionta vonatkozásban nincs adat. Összességében elmondható, hogy közel valamennyi phylumból zömében olyan baktériumok kerültek elő, amelyek vagy szimbionta rokonokkal rendelkeznek, vagy patogének, de mindenképpen hajlamosak az intracelluláris életmódra.



6. ábra. Az *Arcella* fajokból kitenyészett baktériumok törzsfája a főbb taxonok kiemelésével.

Az intracelluláris baktériumok vizsgálata

A első 500 bázis alapján teljes bizonyossággal *Rhizobium gallicum*-ként azonosított baktérium 16S rRNS gén további szakaszának többször megismételt szekvenálása arra utal, hogy egy ismeretlen Rhizobiaceae baktériummal van dolgunk, amelynek legközelebbi rokonai a *Rhizobium* és a *Shinella* fajok. Mivel a baktérium az *A. intermedia* 1 törzsből több, mint félelvet követően ismételt és újra több példányból kitenyészett, feltételezhetően egy hosszú időn át jelenlevő (esetleg állandó) endobiontáról lehet szó. A közeljövőben morfológiai és FISH vizsgálatokkal egészítjük ki a molekuláris eredményeket.

Az intracelluláris baktériumok egy részénél feltételezhető, hogy a gazdát nem csupán rezervoárnak használják, hanem szimbiotaként vannak jelen benne. A *Rhizobium* ismételt megtalálása azonnal felvetette a gondolatot, hogy esetleges nitrogénkötés történik a gazdán belül. Először a plazmidon lokalizált nod faktor és nifH gén jelenlétét vizsgáltam meg pcr segítségével. A gélekpen a nod faktornál várt megfelelő hosszúságú terméket kaptam, míg a

nifH génnél a két alkalmazott primer pár közül csak az egyik adott terméket. A pcr optimalizálása még tart. Az előzetes eredmények arra engednek következtetni, hogy érdemes a vizsgálatot folytatni.

A *Rhizobium* spp. mellett nitrogénkötést igazoltak a *Paenibacillus graminis* fajnál is. A *Bosea* genusban nod faktort azonosítottak, nem kizárt, hogy diazotróf is előkerülhet közülük. Az *Arcella*-ban talált baktérium spektrum tehát tartalmazott olyan taxonokat, amelyek potenciálisan mutualista kapcsolatban lehetnek a gazdával.

A taxonspecifikus primerrel végzett pcr segítségével a patogén baktériumok jelenlétét tudtuk *Arcella*-ban megállapítani (Török és mtsai 2008).

Kapcsolódó publikációk: cikk 1, absztrakt 3, 5, 6-10.

Eredmények értékelése

- Létrehoztam két többéve fennálló *Arcella intermedia* klóntenyészetet, amelyek hosszú távú vizsgálatokra alkalmas kísérleti alanyok lehetnek.
- Sikertült több *Arcella* faj filogenetikai rokonsági viszonyait megállapítani 18S rRNS gén alapú vizsgálatokkal.
- Nagy mennyiségű DNS-mintát gyűjtöttem be és tárolok *Arcella* fajokból amelyekkel további molekuláris vizsgálatokat folytathatok, mind az eukarióta gazda, mind az endobionta baktériumok tekintetében.
- Sikertült molekuláris és *in situ* módszerekkel kimutatnom endobionta baktériumokat, amelyek egy része humán patogén vonatkozású, egy további része a mutualista kapcsolatra hajlamos taxonokhoz tartozik.
- Több éven keresztül tudtam azonos eukarióta klóntenyészet endobiontáit vizsgálni és igazoltam egyes prokarióták állandó jelenlétét. Korábban ilyen vizsgálat – különösen szabadonélő amőbával – nem történt.

A fenti pontokba sűrített tevékenységeim teljesen újszerűek, nem valamely külföldi példa hazai adaptációját jelentik. A filogenetika és az endobionta vizsgálatok összekapcsolása végső soron későbbiekben az ivaros szaporodás hiányára hivatott választ adni. Ezt a megközelítést még senki nem alkalmazta.

Eredmények hasznosíthatósága

Adataim hozzájárulnak az utóbbi évek legfrekvenciáltabb protozoológiai témakörének, a molekuláris filogenetikának eredményeihez, az egyik legismertebb genus, az *Arcella* vonatkozásában sikertült eredményeket elérnem. Az általam kifejlesztett primerek közlést követően további eredményeket hozhatnak a témában.

Az endobionta baktériumok gazdaspektrumát gyarapítottam szabadonélő, potenciálisan mindenhol előforduló gyakori amőba genus, az *Arcella* ismeretével.

Az általam fenntartott kísérleti alany alkalmasnak mutatkozik humán patogének intracelluláris viselkedésének ill. a fertőzés folyamatának tanulmányozására. Ennek kapcsán már külföldi kolléga jelezte együttműködési szándékát.

A feltárt endobionta spektrum közegészségügyi szempontból is figyelemreméltó: a *Legionella* spp., *Bacillus cereus*, *Brevundimonas* sp., Moraxellaceae baktériumok jelenléte a természetes vizekben élő *Arcella*-ban mint rezervoárban zsúfolt fürdőhelyeken komoly következményekkel járhat. A jelenség régebben ismeretlen eredetű bakteriális fertőzésekre adhat magyarázatot.

További kutatások az eredmények tükrében

Az *Arcella* fajokon belüli intraspecifikus polimorfizmus vizsgálatát az ITS régió segítségével érdemes tovább folytatni, törekedve a specifikus primer kidolgozására, amely a gombaszennyeződést nem amplifikálja.

Az *Arcella*-ból baktériumok kimutatása során kapott spektrum több tagja preferálja az endobionta lokalizációt. Ezek között a gazdával mutualista vagy patogén viszonyban levők további kutatása feltétlenül indokolt.

Az *Arcella* egyedek közötti plazmogámia során a prokarióták vándorlását a horizontális géntranszfer kapcsán mindenképpen tanulmányozni kell, kiegészítve a géntranszfert bizonyító szakaszok molekuláris módszerekkel történő keresésével.

Az intraspecifikus polimorfizmus és a horizontális géntranszfer szerepének feltárása választ adhat arra, hogy miért éri meg az *Arcella*-nak és más Amoebozoa szervezeteknek - amelyek az élővilág egyik legősibb és legsikeresebb csoportja - az ivartalan szaporodás.

Hivatkozás a pályázati munkára:

A témában zajló kutatás prezentációit megemlíti a Protist folyóiratban megjelenés alatt álló beszámolóban (l. Mitchell és Gilbert 2010).

Konferencia poszteren már hivatkoztak az 1. számú publikációra:

Corsaro, D., Lara, E., Mitchell, E. A. D.: Searching for endosymbionts in free-living amoebae. Poszter, ISTA 5 (5th International Symposium on Testate Amoebae), Montbéliard, 2009. szeptember 14-17.

Online referenciában szerepel az 1. szmú publikáció: Symbiosis Notes no1. Sept. 2009, Intracellular symbionts of protists, p5,

<http://www.docstoc.com/docs/12291713/Symbiosis-Notes-Sept-2009>

A téma további jelentősége:

Az ELTE Állatrendszertani és Ökológiai Tanszékén sikerült beindítani az Amoebozoa csoport molekuláris vizsgálatára alkalmas labort. Általánosságban, ennek a kutatásnak a keretében kezdődtek meg a Tanszéken belül, saját erőből elvégzett molekuláris filogenetikai vizsgálatok.

A témában való jártasság megszerzése alkalmat ad/adott további Amoebozoa vizsgálatban való konzultációra, együttműködésre.

A téma egy részterületét egy PhD hallgató bővíti tovább.
A téma másik részterületén egyetemi hallgató tdk munkát végez.

A téma elismerése:

Az „V European Congress of Protistology and XI European Conference on Ciliate Biology” konferencián elhangzott előadásom nyomán felkértek az anyag cikk formában történő közlésére a Protistology folyóirat válogatott előadásokat tartalmazó kötetébe.

A 25. DGP konferencián (Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, Salzburg, 2007) a poszterem 2. helyezést ért el.

Együttműködések:

A megkezdett munka híre nyomán külföldi kollégák kerestek meg együttműködés céljából.

Megvalósult együttműködés:

Molecular phylogeny and systematics in lobose testate amoebae (Arcellinida). MTA-DFG projekt, kooperációs partner: Dr. Ralf Meisterfeld, RWTH Aachen, futamidő 2008-2010. MTA/196. (Részemre kutatási támogatást nem nyújt!)

Tervezett együttműködés:

Legionella vizsgálata házas amőbákban. Dr. Klaus Heuner, Robert Koch-Institut, Berlin

Előkészületben levő publikációk (impaktfaktoros protisztológiai szakfolyóiratban):

Az *Arcella* fajokból izolált baktériumokról

Az *Arcella* genus filogenetikai vizsgálata

Az *Arcella formosa* faj morfológiai és filogenetikai vizsgálata, biogeográfiai megjegyzésekkel

Szakirodalom

Bock, R. (2010): The give-and-take of DNA: horizontal gene transfer in plants. Trends in Plant Science, 15(1):11-22

Barker, J., Brown, M.R.W. (1994): Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiology, 140:1253-1259

Deflandre, G. (1928): Le genre *Arcella* Ehrenberg. Archiv für Protistenkunde, 64: 152-287

Fokin, S.I., Schweikert, M., Görtz, H.-D. Fujishima, M. (2003): Bacterial endocytobionts of Ciliophora. Diversity and some interactions with the host. European Journal of Protistology, 39:475-480

Greub, G. & Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clinical Microbiology Reviews, 17:413-433

Hegner, R. W. (1919): Quantitative relations between chromatin and cytoplasm in the genus *Arcella*, with their relations to external characters. Proceedings of the National Academy of Sciences, 5(1):19-22

- Horn M., Wagner, M. (2004): Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(5):509-515
- Jobb, G. (2008): TREEFINDER version of October 2008. Munich, Germany. Distributed by the author at www.treefinder.de
- Lahr D. J. G., Lopes, S. G. B. C. (2009): Evaluating the Taxonomic Identity in Four Species of the Lobose Testate Amoebae Genus *Arcella* Ehrenberg, 1832. *Acta Protozoologica*, 48(2):127-142
- Lara, E., Heger, T. J., Mitchell, E. A. D., Meisterfeld, R., Ekelund, F. (2007): SSU rRNA Reveals a Sequential Increase in Shell Complexity Among the Euglyphid Testate Amoebae (Rhizaria: Euglyphida). *Protist*, 158:229—237
- Lara, E., Heger, T. J., Ekelund, F., Lamentowicz, M., Mitchell, E. A. D. (2008): Ribosomal RNA Genes Challenge the Monophyly of the Hyalospheniidae (Amoebozoa: Arcellinida). *Protist*, 159:165-176
- Lin, D. X., Man, C. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T.X., He, Y. R., Guan, S. H., Chen, W. X. (2008): *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:1409–1413
- Meisterfeld, R. (2001): Arcellinida. In: *An illustrated guide to the protozoa*. 2. kiadás (Szerk.: Lee, J.J., Leedale, G.F., Bradbury, P.). Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas. 2. kötet, 827-860.
- Mitchell, E.A.D., Gilbert, D. (2010): Meeting Report: 5th International Symposium on Testate Amoebae (ISTA-5), Montbeliard, France, 14–17 September 2009 - Present Status of Testate Amoeba Research, Knowledge Gaps and Research Priorities. *Protist*, In Press, Corrected Proof, Published online date 9 April 2010, <http://www.elsevier.de/protis>
- Nägler K. 1910. Fakultativ parasitische Micrococcen in Amöben. *Archiv für Protistenkunde* 19: 246
- Netzel, H. (1975): Struktur und Ultrastruktur von *Arcella vulgaris* var. *multinucleata* (Rhizopoda, Testacea). *Archiv für Protistenkunde*, 117:219-245
- Nicholls, K. H. (2005): *Cyclopyxis acmodonta* n. sp and *Arcella formosa* n. sp.: Two new species of testate rhizopods (Arcellinida, Protozoa) from remnant wetlands in Ontario, Canada. *Canadian Field-Naturalist*, 119(3):403-411
- Nikolaev, S.I., Mitchell, E.A.D., Petrova, N.B., Berney, C., Fahrni, J., Pawlowski, J. (2005): The testate lobose amoebae (Order Arcellinida, Kent, 1880) finally find their home within Amoebozoa. *Protist*, 156:191—202
- Podani J. (1997): SYN-TAX 5.1: A new version for PC and Macintosh computers. *Coenoses*, 12:149-152

- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. (2001): A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22(6):1086-1089
- Saitou, N., Nei, M. (1987): The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406–425
- Smirnov, A., Nassonova, E., Berney, C., Fahrni, J., Bolivar, I., Pawlowski, J. (2005): Molecular Phylogeny and Classification of the Lobose Amoebae. *Protist*, 156:129-142
- Tekle, Y.I., Grant, J., Anderson, O.R., Nerad, T. A., Cole, J. C., Patterson, D. J., Katz, L. A. (2008): Phylogenetic placement of diverse amoebae inferred from multigene analyses and assessment of clade stability within Amoebozoa upon removal of varying rate classes of SSU-rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47:339-352
- Todorov, M., Golemansky, V. (2003): Morphology, Biometry and Ecology of *Arcella excavata* Cunningham, 1919 (Rhizopoda: Arcellinida). *Acta Protozoologica*, 42: 105 - 111
- Török, J. K. (1998): Brief survey of testate amoeba research in Hungary, and a synopsis of species. *Opuscula Zoologica, Budapest*, 31:119-129
- Tsyganov, A., Mazei, Y. (2006): Morphology, biometry and ecology of *Arcella gibbosa* Penard 1890 (Rhizopoda, Testacealobosea). *Protistology*, 4(3):279-294
- Waeschenbach, A., Webster, B. L., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J. (2007): Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45:311–325
- Watkins, R.F., Gray, M. W. (2006): The frequency of eubacterium-to-eukaryote lateral gene transfers shows significant crosstaxa variation within Amoebozoa. *Journal of Molecular Evolution*, 63: 801—814
- Watkins, R.F., Gray, M. W. (2008): Sampling gene diversity across the supergroup amoebozoa: Large EST data sets from *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, *Physarum polycephalum*, *Hyperamoeba dachnaya* and *Hyperamoeba* sp. *Protist*, 159:269-281
- Wylezich, C., Meisterfeld, R., Meisterfeld, S., Schlegel, M. (2002): Phylogenetic analyses of small subunit ribosomal RNA coding regions reveal a monophyletic lineage of euglyphid testate amoebae (order Euglyphida). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(2):108-118