

*A dimorfizmus molekuláris és
citológiai vizsgálata
Schizosaccharomyces japonicusban*



**Készítette: Bozsik Anikó Ph.D. hallgató
Debreceni Egyetem, Genetikai
és Molekuláris Biológiai Tanszék**

Debrecen, 2002

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS	3. oldal
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4. oldal
2.1. A dimorfizmus jelensége és előfordulása a gombák világában	4. oldal
2.2. A dimorfizmus citológiája	4. oldal
2.3. A dimorf átalakulást befolyásoló környezeti tényezők	6. oldal
2.4. A dimorf átalakulás molekuláris háttere	6. oldal
2.5. A <i>S. japonicus</i> helye az evolúciós törzsfán	7. oldal
2.6. A <i>S. japonicus</i> mint modell a dimorfizmus vizsgálatára	8. oldal
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	10. oldal
3.1. Törzsek és táptalajok	10. oldal
3.1.1. Felhasznált törzsek	10. oldal
3.1.2. Fajnevek rövidítései	10. oldal
3.1.3. Alkalmazott plazmidok	14. oldal
3.1.4. Alkalmazott tápközegek	15. oldal
3.2. Kísérleti módszerek	16. oldal
3.2.1. Mutánsok izolálása	16. oldal
3.2.2. Rekombinációs gyakoriság mérése	17. oldal
3.2.3. Auxotróf mutánsok csoportosítása	18. oldal
3.2.4. Az egyes auxotróf csoportok helyének meghatározása a bioszintetikus útvonalakban	19. oldal
3.2.5. Protoplaszt fúzió	19. oldal
3.2.6. Koffein-és benomylérzékenység vizsgálata	20. oldal
3.2.7. Pulzáló erőterű gélelektroforézis	20. oldal
3.2.8. Mikroszkopizálás	21. oldal
3.2.9. Molekuláris módszerek	22. oldal
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK	24. oldal
4.1. Eredmények	24. oldal
4.1.1. Az élesztősejtek és a hifák mitózisának összehasonlítása	24. oldal
4.1.2. Elektroforetikus kariotipizálás	25. oldal
4.1.3. Auxotróf mutánsok izolálása	27. oldal
4.1.4. Az auxotróf mutánsok csoportosítása	28. oldal
4.1.5. Protoplaszt fúzió alkalmazása	30. oldal
4.1.6. A kettős mutáció kimutatása egy ura^- mutánsban	31. oldal
4.1.7. Kapcsoltságok az egyes auxotróf gének között	32. oldal
4.1.8. Az egyes auxotróf csoportok beazonosítása	33. oldal

4.1.9. <i>myc</i> mutánsok izolálása és csoportosítása.....	35. oldal
4.1.10. Diploid sejtek hifaképzése.....	38. oldal
4.1.11. Klasszikus komplementáció a <i>myc</i> mutánsok diploidjainál.....	39. oldal
4.1.12. A <i>myc</i> mutánsok valuoláris mintázata	40. oldal
4.1.13. A <i>myc</i> törzsek koffeinérzékenység-vizsgálata.....	41. oldal
4.1.14. A <i>myc</i> mutánsok tesztelése benomyllal szembeni rezisztenciára.	44. oldal
4.1.15. Transzformációs kísérletek.....	45. oldal
4.1.15.1. Auxotróf mutánsok transzformálás prototróffá.....	45. oldal.
4.1.15.2. Transzformálás rezisztenciagénekkel.....	45. oldal
4.1.16. Fajazonos ARS izolálása <i>S. japonicus</i> ból.....	46. oldal
4.1.17. Az 1,5 kb fragment szekvenciája.....	49. oldal
4.1.18. Homológia keresése.....	50. oldal
4.1.19. Transzformálás <i>S. pombe cut1</i> génnel.....	51. oldal
4.1.20. A 2,5 kb-os fragment szekvenciája.....	52. oldal
4.1.21. Rokonsági kapcsolatok a homológiák alapján.....	52. oldal
4.1.22. Az integratív transzformálás bizonyítása.....	53. oldal
4.1.23. Transzformációs hatások.....	54. oldal
4.1.24. A hipotetikus ARS szerepe <i>S. pombe</i> ben.....	55. oldal
4.1.25. A hipotetikus <i>S. japonicus</i> ARS alkalmazása.....	56. oldal
4.2. Eredmények értékelése.....	57. oldal
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	63. oldal
6. TOVÁBBI TERVEK.....	66. oldal
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	67. oldal
8. REFERENCIÁK.....	68. oldal
9. FÜGGELÉK.....	74. oldal
9.1. A témában megjelent főszerzős cikkek.....	74. oldal
9.2. Egyéb társzerzős cikkek.....	74. oldal

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

A patogén gombák között gyakoriak a dimorf (kétféle morfológiai állapotban: egysejtű és fonalas formában létező) fajok. Ezeknél a virulencia gyakran egyik, vagy másik megjelenési formához kötődik. Az élesztőgenetikai kutatásokban még kevésbé ismert modellszervezet, a hasadóélesztő *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* szintén dimorfizmust mutató gomba, ám nem patogén, azaz semmilyen ismert megbetegedést nem okoz, ezért veszélytelenül tanulmányozható rajta a két morfológiai állapot közötti átalakulás. Mivel a dimorfizmus számos patogén gombafajnál virulenciafaktorként szerepel, a morfológiai átalakulást szabályzó gének megismerésével eredményesebben vehető fel a harc az ismert humán dermatomycosisok és szisztémás mycosisok ellen.

Továbbá, a *S. japonicus* az eddig ismert három hasadóélesztőgombafaj egyikeként közeli rokonságban áll a már jól ismert, az élesztőgenetikai kutatásokban rutinszerűen alkalmazott *S. pombe*-vel, így új modellszervezetként való bevezetését nagymértékben megkönnyítik az *S. pombe*-ra kidolgozott, bevált molekuláris biológiai módszerek. Ez azért is lényeges, mert új fajok bevezetése a genetikai kutatásba a fajok közötti genetikai állomány összehasonlítására (intergenerikus összevetésekre), ezáltal evolúciós következtetések levonására adhat lehetőséget.

CÉLKITŰZÉS

- Célul tűztük ki, hogy a *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*-t, - mely még kevésbé alkalmazott modellszervezet - jobban megismertetjük a genetikai kutatások számára, ehhez a vele való klasszikus genetikai és molekuláris biológiai munka alapjait kívántuk lefektetni.
- Auxotróf mutáns törzseket szerettünk volna izolálni, mivel az auxotróf mutációk jól követhető és egyszerűen detektálható genetikai markerekként szerepelhetnek a kísérletes munkákban.
- Munkánk során a dimorf átalakulásban sérült mutánsokat kívántunk létrehozni és ezek citológiai, sejtszerkezetbeli jellegzetességeit vizsgálni.
- A dimorf átalakulásban mutáns törzsek genetikai hátterét kívántuk tanulmányozni, a morfológiai változásban szerepet játszó géneket megismerni.
- A *S. japonicus* számára alkalmas transzformációs rendszert kívántunk létrehozni. Ehhez megfelelő transzformációs plazmid konstrukcióját terveztük.
- Szerettünk volna továbbá a *S. japonicus*-ban olyan géneket beazonosítani, melyek funkcionális homológjait más fajokban már ismerjük.
- A *S. japonicus*-ból izolált gének szekvencia-analízisével más, ismert fajokkal való rokonságait, a köztük levő evolúciós távolságokat szerettük volna jobban megismerni.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A dimorfizmus jelensége és előfordulása a gombák világában

A mikroszkópikus gombák világában a dimorfizmus gyakori jelenség: a dimorf gombák mind egysejtű (ún. élesztő), mind többsejtű hifákból álló (ún. micéliális) alakban előfordulhatnak. Az átalakulást - mely többnyire reverzibilis folyamat - , külső környezeti indukciós tényezők váltják ki. A dimorfizmus tulajdonképpen felfogható differenciálódásnak is, ami hasonlít az állatok és növények testében bekövetkező sejttypusok kialakulásához.

Számos, a növény- és állatvilágban jól ismert patogén gombafaj mutat dimorfizmust. Ezek között sok, enyhébb-súlyosabb megbetegedést okozó humán vonatkozású species akad. E gombák többségénél a betegséget okozó virulens állapot az egyik vagy a másik megjelenési formára korlátozódik. A metamorfózis tehát virulenciafaktorként viselkedik ezekben a fajokban. A növénypatogén *Mucor*, *Rhizopus*, *Ustilago*... stb. genusok illetve a humán patogén *Candida albicans* például többsejtű hifaalakban virulens míg a legtöbb, szisztémás mikózist okozó humánpatogén gombafaj, pl. *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Yarrowia lipolytica*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Scopulariopsis brevicaulis* ...stb. egysejtű, élesztőformája okozza a betegséget (pl. Sanchez-Martinez és tsi., 2001; Sia és tsi., 2000).

A nem patogén gombáknál a dimorfizmus valószínűleg azért jön létre, mert így próbálnak eredményesek maradni mind a folyékony (élesztő) és mind a szilárd (mycelium) szubsztrátumokon. Filogenetikai értelemben az látszik valószínűnek, hogy a fonal az ősből és az élesztő az újabb keletű. A *Schizosaccharomyces*ek között a *S. japonicus* ősből, még őrzi a fonalas formát is, a többi faj újabb (Sipiczki, 1995; Sipiczki, 2000).

2.2. A dimorfizmus citológiája

A dimorf átalakulás citológiáját számos fajban vizsgálták. Azt találták, hogy ez a folyamat rendkívül sokrétű, szerteágazó intracelluláris változás következménye. Az egyik ilyen nagymérvű változás a sejtpolaritás terén következik be: *Saccharomyces cerevisiae* diploid sejtjei például N éhezésre pszeudomicéliumot képeznek azáltal, hogy az eddigi bipoláris helyett unipoláris sarjadzásra térnek át (Gimeno és tsi., 1992). A *Candida albicans* csíratömlőinek kialakulása is a sejtnövekedés unipolárisává válásának (csak egyik sejtvégen való növekedés) eredménye (Gow, 1997). *S. pombe*-ben talált, sejtszeparációban mutáns, fonalas törzseknél (sep) azonban a sejtek megtartják bipoláris növekedésüket (Grallert, 1997). Mint a legtöbb dimorf gombafajban, a *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*-ban is a sejt polarizációja az élesztő-micéliális átalakulás első lépése: az élesztősejtek, melyek korábban mindkét végükön egyforma mértékben

nőttek hirtelen elkezdenek megnyúlni az egyik végükön, miközben a másik sejt-póluson leáll a növekedés. Feltételezhető, hogy a gyors megnyúlást az teszi lehetővé, hogy a citoplazma sok, apró vakuóluma fuzionál egy nagy vakuóummá, melynek ürege egyre növekszik (Sipiczki és tsi., 1998 b). Ez a nagy vakuólum a sejt egyik - a későbbi nem növekvő végére (proximális helyzetbe) - kerül, ezzel mintegy kijelöli, determinálja a sejt csendes, nem növekvő pólusát, tehát a polaritás kialakulásának alapvető meghatározója. A maradék citoplazma a megnyúlt sejt disztális, intenzíven növekvő végébe kerül (Sipiczki és tsi., 1998 b). Így a hifasejtek aszimmetrikusan osztódnak: a csúcsi végen létrejövő kisebb méretű új sejt öröklí a citoplazma legnagyobb részét, míg a tőle proximálisan fekvő nagyobb méretű leánysejtben marad a nagy vakuólum. Ez eltér a *Saccharomyces cerevisiae* pszeudohifáinak osztódásától: ott a sejtek szimmetrikusan (ugyanolyan méretű anya- és leánysejt) osztódnak (Kron és tsi., 1994). Ilyen aszimmetrikusan osztódó hifafonalaknál igazolták, hogy a nagy vakuólumot öröklő szubapikális sejt citoplazmája kevés egy újabb osztódáshoz, ezért csak akkor tud belépni a sejtciklusba, ha már elegendő mennyiségű citoplazmaállományt képzett. Ekkor - a sejtfonalban a csúcstól már jócskán távol elhelyezkedő - sejt osztódik, ezáltal keletkeznek az elágazások (Gow 1997).

A vakuolizációnak meghatározó szerepe van a hifanövekedésben: *Candida albicans*ban azt találták, hogy a vakuólumképződés megakadályozásával (például magas ozmotikus koncentráción) nem volt képes csíratömlők fejlesztésére (Gow, 1994). *S. japonicus*ban is megfigyelhető ez a jelenség: vakuólumok hiányában nem képez invazív micéliumot (Sipiczki és tsi., 1998 b).

Az élesztő és a hifaalak aktineloszlási képét vizsgálva is különbségeket találunk a két megjelenési forma között: hasadóélesztőkben az aktinrögök az intenzív sejtfalképzés helyén, azaz az osztódó sejt szeptuma mentén és a sejt intenzíven növekvő csúcsain helyezkednek el (Marks és tsi., 1986). A hifáknál az intenzíven növekvő csúcs az apikális hifavég, tehát a sejtnak csak ezen a végén található aktin, szemben az élesztők bipólusos növekedésével, ahol mindkét sejtvégre egyaránt csoportosulnak aktinmolekulák (Sipiczki és tsi., 1998 b). A mikrotubulusok elrendeződése sem teljesen azonos a hifák és élesztők citoplazmájában. Míg az élesztősejtekben a mikrotubulusok a két sejt-pólus között a sejt egész hosszában futnak (Hagan és tsi., 1988), addig hifáknál csak a citoplazmában gazdag sejtrészek (pl.: apikális vég) tartalmaznak mikrotubulusokat, a vakuólomokba illetve a vakuólum és a sejtfal közötti vékony citoplazmarétegbe már nem hatolnak be (Sipiczki és tsi., 1998 b). Ezen citoszkeletáris elemek bizonyítottan fontos szerepet töltenek be az organelum- és anyagtranszportban (Terasaki és tsi., 1994 ; Allan, 1995) tehát ezen anyagok a hifák nagy vakuólumot tartalmazó részeire valószínűleg nem jutnak el (Sipiczki és tsi., 1998 b).

A dimorf átalakulást számos sejtszerkezeti változás kíséri mely érinti a sejtfalat, a membránszerkezetet és a citoszkeletális rendszer elrendeződését. Erről keveset tudunk a *S. japonicus*nál, az ismert adatok főleg más fajok vizsgálatából származnak. A lipideknek bizonyítottan nagy szerepük van a dimorfizmus szabályozásában. Patogén gombáknál (*Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*) tapasztalták, hogy az élesztő-micéliális átalakulás során lényeges változások mennek végbe a sejtmembránban: a foszfatidilinozitol és foszfatidilszerin mennyisége

csökken, míg a foszfatidilkoliné nő (Kitayama, 2000). E változásért felelős egyik legfontosabb enzim a foszfolipáz D, mely ugyan nem esszenciális a metamorfózisban de befolyásolja annak hatékonyságát (Hube és tsi., 2001). *Candida albicans*ban vizsgálták, hogy a hifák sejtmembránjának ATP-függő H^+ -transzportja intenzívebb mint az élesztőforma esetében, ami azt jelenti, hogy az ATP-áz szabályozó szerepet tölt be e faj dimorfizmusában (Kaur és tsi., 1991). Az aktin citoskeleton pedig sok fajban nagymértékben polarizáltnak bizonyult, az aktin fehérjében bekövetkezett mutációk a hifaképzés hibáihoz vezettek (Cali és tsi., 1998).

2.3. A dimorf átalakulást befolyásoló környezeti tényezők

A metamorfózis reverzibilis folyamat, amit számos tényező befolyásol: hőmérséklet, kémhatás, a tápközeg halmazállapota, tápanyagok és egyes metabolikus vegyületek jelenléte, redox potenciál, toxikus anyagok. Ezek a környezeti tényezők hatással vannak a morfológiai átalakulás irányára. A N-éhezés például *Saccharomyces cerevisiae*-nél az egysejtűből a pseudomicéliális állapotba való átalakulást váltja ki (Gimeno és tsi., 1992), ezzel szemben, ugyanez a körülmény *Yarrowia lipolytica*-nál gátolja a fonalas formába való átalakulást (Szabo, 1999). Nagy mennyiségű poliamin (*Yarrowia lipolytica*) (Guevara-Olvera és tsi., 1993) vagy foszfát (*Ceratocystis minor* var. *barrasii*) (Biel és tsi., 1997) jelenléte a táptalajban elősegíti a hifaképződést. A tápközegben jelenlévő L-aminosavak szintén befolyásolják a metamorfózis irányát *Mucor rouxi*-ban (Leija és tsi., 1986). Magas CO_2 -koncentráció is kiválthat hifafonalas formából élesztőalakba való átmenetet *Mucor* specieseknél (Orłowski, 1991); ezt a *Ceratocystis minor* var. *barrasii* (Biel és tsi., 1997) és a *Scopulariopsis brevicaulis* (Paula és tsi., 1987) fajok esetében is bizonyították. A tápközeg pH-változása szintén jelentős hatással van a metamorfózisra (*Candida albicans*) (Stewart és tsi., 1989). A hőmérséklet $25^{\circ}C$ -ról $37^{\circ}C$ -ra való emelkedése pedig számos patogén faj számára az egyik legerősebb szignál, mely az ártalmatlan hifafonalas „penész”-formából a patogén élesztőformában való szaporodás felé irányítja az organizmust (*Histoplasma capsulatum*) (Medoff és tsi., 1981).

A *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* esetében a metamorfózis csak szilárd táptalajon játszódik le 17 és $37^{\circ}C$ hőmérsékleti intervallumok között. Ha a hifákat folyékony tápközegbe oltjuk át, azok ismét egysejtű élesztőkké fragmentálódnak (Sipiczki és tsi., 1998 a,b).

2.4. A dimorf átalakulás molekuláris háttere

A dimorf átalakulást szabályzó molekuláris háttérrel még keveset tudunk *S. japonicus*ban. Sok fajban bizonyított tény, hogy az intracelluláris cAMP-szint erőteljes változása a morfológiai változás beindulásának előfeltétele (Mayorga és tsi., 1998; Sipiczki és tsi., 1998 b; Medoff és tsi.,

1981). A legtöbb gombafajban a cAMP szintjének erős lecsökkenése szükséges az egysejtűből fonalas formába való áttéréshez (*Scizosaccharomyces japonicus*, *Mucor racemosus*) (Mayorga és tsi.,1998; Sipiczki és tsi.,1998 b). Az adenilát cikláz kódoló génben történt mutáció állandósult, konstitutív fonalas fenotípust eredményez (Mayorga és tsi.,1998, ; Gold és tsi., 1994). A koffein és a teofillin olyan vegyüetek, melyek befolyásolják a cAMP-szintet ezáltal hatással vannak a metamorfózisra is. *S. japonicus*ban a koffein jelenléte a tápközegben (5 mM) megakadályozza a hifák kialakulását mivel magas szinten tartja az intracelluláris cAMP-szintet azáltal, hogy gátolja a cAMP-foszfodiészteráz működését (Sipiczki és tsi.,1998 b). Más fajokban (*Histoplasma capsulatum*) épp ellenkezőleg, intracelluláris cAMP-felhalmozódás szükséges a micéliális formába való átalakuláshoz (Medoff és tsi., 1981). *Saccharomyces cerevisiae*-ben kiderítették, hogy az ivaros szaporodási útvonallal részben átfedő MAP-kináz kaszkád szabályozza a hifanövesztést. Hasonlóan ehhez, a legtöbb élesztőfajban is sok olyan enzim szabályozza a dimorf átalakulást, mely az ivaros szaporodás beindításában is részt vesz (Gow, 1997). A részben közös útvonalat ezekben a fajokban az magyarázza, hogy mind az ivaros szaporodás beindítása, mind pedig az élesztő-micéliális átalakulás éhezést, mint indukciós szignált igényel, az éhezés pedig cAMP-szint csökkenést vált ki (Maeda és tsi., 1990). Ugyanakkor számos más, különálló vagy egymással átfedő szignáltranszdukciós útvonal létezik melyeken keresztül a hifanövekedés indukálódhat. A dimorf átalakulás közvetlen aktiválásáért felelős molekulákat kutatva sok fajban C2H2-típusú cink ujj transzkripciós faktort találtak, mely képes volt cisz-aktiválni számos feltételezett stresszgén transzkripcióját, melyek között a dimorf átalakulás folyamatához bizonyítottan szükséges gének is szerepeltek (Hurtando és tsi., 1999; Ramon és tsi., 1999).

2.5. A *S. japonicus* helye az evolúciós törzsfán

A *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* az Ascomyceták közé a *Schizosaccharomycetales* rendbe tartozik, mely egyetlen családdal (*Schizosaccharomycetidae*) rendelkezik. Ez a faj fejlődéstörténetileg ősi ág sarja. Emiatt közelebb áll az állatokhoz, mint a többi gomba, jobban extrapolálhatók a vele elért eredmények az állati differenciálódásra is (Sipiczki, 2000). Riboszómális RNS szekvencia-összehasonlítások alapján kiderült, hogy a *Saccharomyces*ek és a *Schizosaccharomyces*ek között óriási evolúciós távolság van (Kurtzman, 1989). Ezen szekvencia-adatok azt sugallják, hogy a *Schizosaccharomyces* vonal evolúciós rátája lassabb mint a *Saccharomyces* ágé, tehát a két genus közötti távolság megközelítőleg akkora, mint a *Schizosaccharomyces*ek és a magasabbrendű állatok között (Sipiczki, 1995).

2.6. A *S. japonicus* mint modell a dimorfizmus vizsgálatára

A *S. japonicus* szaprofita, gyümölcsökön szaporodó organizmus. Életciklusa haploid vegetatív fázisból és ivaros szaporodásból áll (2. ábra). Vegetatív szaporodása kettéhasadás: a hosszúkás, haploid élesztősejtek növekszenek majd a megfelelő méretet elérve közepén harántszeptumot képeznek és e mentén két utódsejtre hasadnak. Szilárd tápközegben az idősödő sejtekben végbemegy a dimorf átalakulás (Sipiczki és tsi., 1998 a,b). Az élesztősejtek 8-10 nap után egy-egy pontból eredő, a valódi gombákra jellemző elágazó hifafonalakat fejlesztenek.

A hifákat alkotó fonalas sejtek intakt szeptumokkal határolódnak, az elágazások mindig a szeptumok alatt kezdődnek. A hifák a táptalaj felszínén futva (felszíni hifák) vagy a médiumba belenőve (invazív hifák) micéliumot alkotnak. A hifafonalak növekedési irányát a tápanyaggrádiens (elsősorban a N koncentráció) irányítja: mindig a magasabb tápanyag-koncentráció irányába törekszenek . A *S. japonicus*nál a morfológiai átalakulás és a hifaképzés valószínűleg a tápanyagban dúsabb helyek felé történő gyors helyzetváltoztatást teszi lehetővé. Ezért a hifák mindig a telep felől kifelé, divergensen, egymástól széttartóan igyekeznek növekedni. (1. ábra)



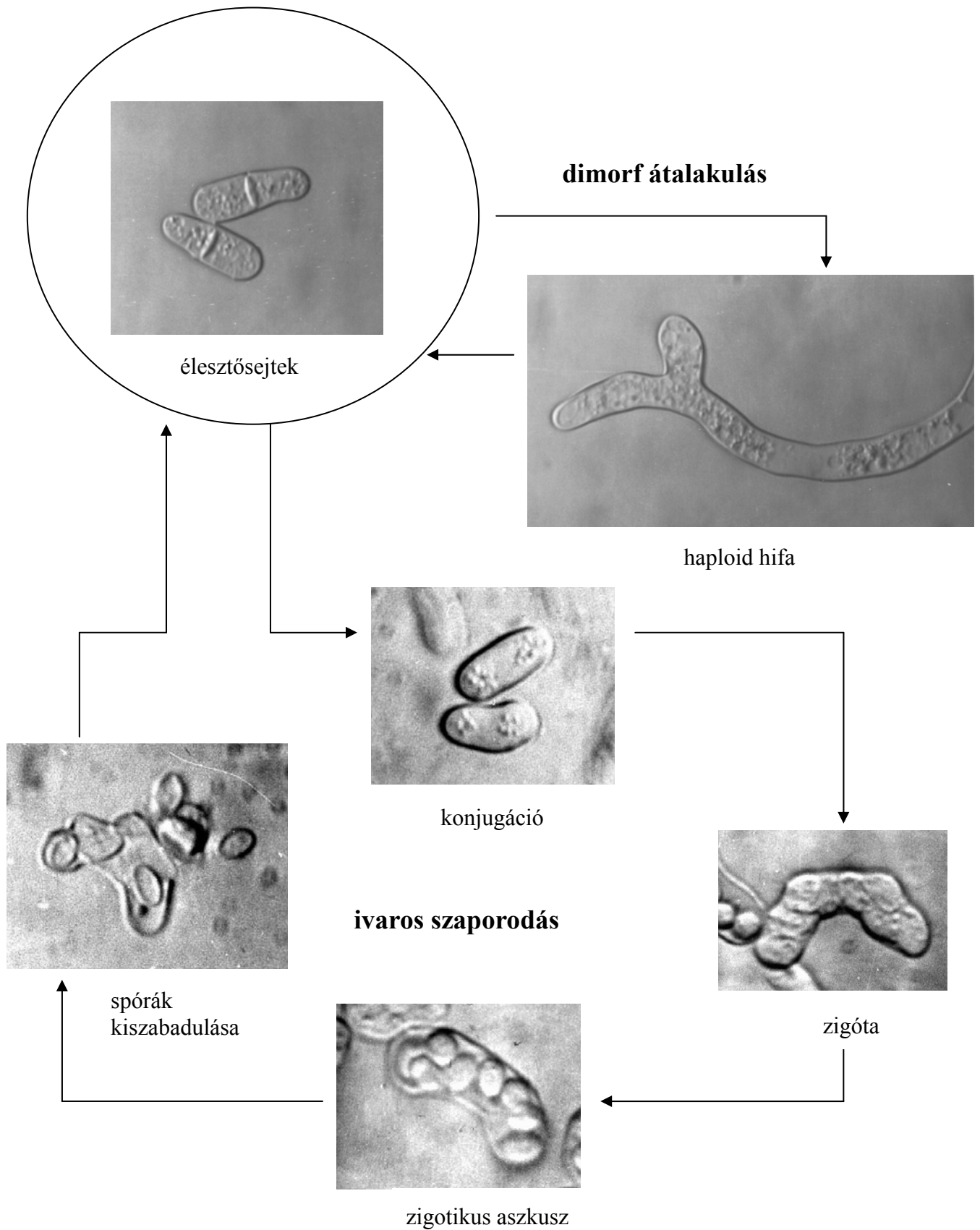
1. ábra
A hifák divergens növekedése

A dimorf átalakulás azonban kizárólag szilárd tápközegen játszódik le, folyékony táptalajban a már kialakult hifák újból egyedi élesztősejteké esnek szét. Az előregedő hifák később a szeptum mentén ivartalan kitartóképletekké (arthrospórákká) fragmentálódnak. Az élesztő – micéliális átalakulást számos tényező befolyásolja, ilyen pl. a hőmérséklet is: 19 °C alatt és 35 °C felett a a folyamat nem játszódik le (Sipiczki és tsi., 1998 a).

Nitrogénéhezés hatására végbemegy az ivaros szaporodás. Az élesztősejtek konjugálnak és diploid zigótát képeznek. A zigótában azonnal végbemegy a meiózis majd a meiózis után egy mitotikus osztódás is történik így 8 darab, zigotikus askuszból 8 haploid askospóra keletkezik melyek kedvező körülmények között kicsíráznak és belépnek a vegetatív ciklusba.

A *S. japonicus* tehát haploid szervezet, diploid állapota csak a rövid életű zigótára korlátozódik; ez a sajátság előnyös a mutánsaival végzett vizsgálatokban hiszen minden, genotípusosan bekövetkező mutáció azonnal megnyilvánul a fenotípus szintjén is.

ivartalan szaporodás



2. ábra

A. S. japonicus életrciklusa Sipiczki és tsi., 1998 a,b alapján

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 TÖRZSEK ÉS TÁPTALAJOK

3.1.1 Felhasznált törzsek

A felhasznált törzseket az 1. táblázat tartalmazza

Törzs-könyvi szám	Törzs megnevezése*	Megjegyzés	Izolálta
	<i>Eschericia coli DH5α</i>		Hanahan 1983 Származás: Bethesda Research Laboratoties
0-1	<i>S. pombe L 972</i>	vad törzs	Lindner, 1893 A Bern Collection, Svájc törzsgyűjteményéből kaptuk meg
0-38	<i>S. pombe leu1-32</i>		A Bern Collection, Svájc törzsgyűjteményéből kaptuk meg
0-92	<i>S. pombe ura4-D18</i>		A Bern Collection, Svájc törzsgyűjteményéből kaptuk meg
7-1	<i>S. japonicus</i> (CC4 44-5-1) (CBS 354)	vad törzs	Yukawa és Maki, 1931 (A Czechoslovak Collection of Yeasts (CCY) Bratislava, Slovakia törzsgyűjteményből kaptuk meg.)
7-6	<i>S. japonicus lys4-6</i>		László Csilla
7-10	<i>S. japonicus ura1-15</i>		László Csilla
7-13	<i>S. japonicus ade1-5</i>	backmutációra hajlamos	László Csilla
7-14	<i>S. japonicus ura3-17</i>		László Csilla
7-16	<i>S. japonicus ura2-16 myc-15</i>	myc ⁺⁺ mutáns. Folyadékban is képez hifát, ha leülepszik!	László Csilla
7-18	<i>S. japonicus arg3-13</i>		László Csilla
7-22	<i>S. japonicus</i> (DBVPG 6372) (CBS 2629)	vad törzs	Perugia, A. Martini
7-27	<i>S. japonicus lys1-2</i>		Kerekes Ágnes
7-28	<i>S. japonicus lys-3</i>	backmutációra hajlamos	Kerekes Ágnes
7-29	<i>S. japonicus lys1-4</i>		Kerekes Ágnes
7-30	<i>S. japonicus lys3-5</i>	backmutációra hajlamos	Kerekes Ágnes

7-31	<i>S. japonicus arg1-1</i>		Kerekes Ágnes
7-32	<i>S. japonicus arg2-2</i>		Kerekes Ágnes
7-33	<i>S. japonicus arg3-3</i>		Kerekes Ágnes
7-34	<i>S. japonicus arg4-4</i>		Kerekes Ágnes
7-35	<i>S. japonicus arg1-5</i>	nehezen spórázik	Kerekes Ágnes
7-36	<i>S. japonicus arg3-6</i>		Kerekes Ágnes
7-37	<i>S. japonicus arg2-7</i>	nagyméretű sejtek	Kerekes Ágnes
7-38	<i>S. japonicus arg5-8</i>	backmutációra hajlamos	Kerekes Ágnes
7-39	<i>S. japonicus arg4-9</i>		Kerekes Ágnes
7-40	<i>S. japonicus arg1-10</i>		Kerekes Ágnes
7-41	<i>S. japonicus arg3-11</i>		Kerekes Ágnes
7-43	<i>S. japonicus ade1-1</i>	gyengén spórázik, backmutációra hajlamos	Kerekes Ágnes
7-44	<i>S. japonicus ade2-2</i>	gyengén spórázik, backmutációra hajlamos	Kerekes Ágnes
7-45	<i>S. japonicus ade3-3</i>	enyhén pirosas	Kerekes Ágnes
7-46	<i>S. japonicus ade3-4</i>	alig pirosas	Kerekes Ágnes
7-47	<i>S. japonicus ura1-1</i>		Kerekes Ágnes
7-48	<i>S. japonicus ura1-3</i>		Kerekes Ágnes
7-49	<i>S. japonicus ura2-5</i>	sok abnormális spóraszámú aszkusz	Kerekes Ágnes
7-50	<i>S. japonicus ura2-6 myc-1</i>	sok abnormális spóraszámú aszkusz, gyakran YEA-n is bespórázik, myc ⁻ mutáns. Lassú növekedés	Kerekes Ágnes
7-51	<i>S. japonicus ura1-7</i>		Kerekes Ágnes
7-52	<i>S. japonicus ura1-8 ura3-8 myc-2</i>	myc ⁻ mutáns	Kerekes Ágnes
7-53	<i>S. japonicus ura2-9</i>		Kerekes Ágnes
7-54	<i>S. japonicus ura2-10</i>		Kerekes Ágnes
7-55	<i>S. japonicus ura1-12</i>		Kerekes Ágnes
7-56	<i>S. japonicus leu1-1</i>	nincs spóráképzés, talán meiózisban sérült mutáns	Kerekes Ágnes
7-57	<i>S. japonicus leu1-2</i>	csökkent spórázás ; backmutációra hajlamos	Kerekes Ágnes
7-58	<i>S. japonicus leu2-3</i>		Kerekes Ágnes
7-59	<i>S. japonicus leu2-4</i>		Kerekes Ágnes
7-60	<i>S. japonicus leu3-7</i>	gyenge spórázás	Kerekes Ágnes
7-62	<i>S. japonicus leu1-9</i>		Kerekes Ágnes

7-63	<i>S. japonicus leu3-10 myc-4</i>	myc^{-} mutáns	Kerekes Ágnes
7-65	<i>S. japonicus</i> (DBVPG 6371) (CBS 5679)	vad törzs	Perugia, A. Martini
7-66	<i>S. japonicus arg5-14</i>		Bozsik Anikó
7-67	<i>S. japonicus arg5-15</i>	enyhén hajlamos backmutációra	Bozsik Anikó
7-68	<i>S. japonicus arg5-16</i>	5 mM-os koffeinen is képez hifát	Bozsik Anikó
7-70	<i>S. japonicus leu2-6</i>		Bozsik Anikó
7-73	<i>S. japonicus ura2-11</i>	leaky mutáns	Bozsik Anikó
7-74	<i>S. japonicus ura1-13</i>		Bozsik Anikó
7-75	<i>S. japonicus ura2-14</i>		Bozsik Anikó
7-76	<i>S. japonicus ura4-19</i>		Bozsik Anikó
7-77	<i>S. japonicus ura4-20</i>		Bozsik Anikó
7-78	<i>S. japonicus</i> <i>ura2-21 myc-3</i>	YEA táptalajon hajlamosak lekerekedni a sejtek; myc^{-} mutáns	Bozsik Anikó
7-79	<i>S. japonicus ura4-22</i>		Bozsik Anikó
7-80	<i>S. japonicus ura4-23</i>		Bozsik Anikó
7-81	<i>S. japonicus ura4-24</i>	UV –re érzékeny	Bozsik Anikó
7-82	<i>S. japonicus ura4-25</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-83	<i>S. japonicus ade4-6</i>	liláspiros	Bozsik Anikó
7-86	<i>S. japonicus lys2-1 myc-18</i>	myc^{++} mutáns	Bozsik Anikó
7-88	<i>S. japonicus lys2-1 myc-20</i>	myc^{++} mutáns	Bozsik Anikó
7-92	<i>S. japonicus lys2-1 myc-24</i>	myc^{++} mutáns	Bozsik Anikó
7-95	<i>S. japonicus ura4-24 myc-9</i>	myc^{-} mutáns	Bozsik Anikó
7-96	<i>S. japonicus ura4-24 myc-10</i>	myc^{-} mutáns	Bozsik Anikó
7-99	<i>S. japonicus lys2-1 myc-5</i>	myc^{-} mutáns	Bozsik Anikó
7-100	<i>S. japonicus arg1-1 myc-6</i>	myc^{-} mutáns	Bozsik Anikó
7-101	<i>S. japonicus ura4-24 myc-7</i>	myc^{-} mutáns	Bozsik Anikó
7-102	<i>S. japonicus ura4-24 myc-8</i>	myc^{-} mutáns	Bozsik Anikó
7-103	<i>S. japonicus lys6-7</i>		Bozsik Anikó
7-104	<i>S. japonicus lys5-8</i>		Bozsik Anikó
7-105	<i>S. japonicus lys5-9</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-106	<i>S. japonicus lys1-10</i>		Bozsik Anikó
7-107	<i>S. japonicus lys7-11</i>		Bozsik Anikó

7-108	<i>S. japonicus lys5-12</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-109	<i>S. japonicus lys2-13</i>		Bozsik Anikó
7-110	<i>S. japonicus lys5-14</i>		Bozsik Anikó
7-111	<i>S. japonicus lys3-15</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-112	<i>S. japonicus lys5-16</i>		Bozsik Anikó
7-113	<i>S. japonicus lys6-17</i>		Bozsik Anikó
7-114	<i>S. japonicus arg2-19</i>		Bozsik Anikó
7-115	<i>S. japonicus arg1-20</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-116	<i>S. japonicus arg7-21</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-118	<i>S. japonicus arg1-23</i>		Bozsik Anikó
7-119	<i>S. japonicus arg3-25</i>		Bozsik Anikó
7-120	<i>S. japonicus arg5-26</i>		Bozsik Anikó
7-121	<i>S. japonicus arg1-27</i>		Bozsik Anikó
7-122	<i>S. japonicus arg6-28</i>		Bozsik Anikó
7-123	<i>S. japonicus arg1-29</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-124	<i>S. japonicus leu2-11</i>		Bozsik Anikó
7-125	<i>S. japonicus leu2-13</i>		Bozsik Anikó
7-126	<i>S. japonicus leu2-14</i>		Bozsik Anikó
7-128	<i>S. japonicus ade1-8</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-129	<i>S. japonicus ade1-9</i>		Bozsik Anikó
7-130	<i>S. japonicus ade3-11</i>	erősen piros; backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-131	<i>S. japonicus ade4-12</i>	erősen piros	Bozsik Anikó
7-133	<i>S. japonicus ade3-15</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-134	<i>S. japonicus ade3-17</i>	piros	Bozsik Anikó
7-135	<i>S. japonicus ade3-18</i>	piros	Bozsik Anikó
7-136	<i>S. japonicus ade3-19</i>	piros	Bozsik Anikó
7-137	<i>S. japonicus ade3-20</i>	enyhén pirosas	Bozsik Anikó
7-138	<i>S. japonicus ura4-26</i>		Bozsik Anikó
7-139	<i>S. japonicus ura4-27</i>		Bozsik Anikó
7-140	<i>S. japonicus ura2-28</i>		Bozsik Anikó

7-141	<i>S. japonicus ura2-29</i>		Bozsik Anikó
7-142	<i>S. japonicus ura2-30</i>	backmutációra hajlamos	Bozsik Anikó
7-143	<i>S. japonicus ura1-32</i>		Bozsik Anikó
7-144	<i>S. japonicus ura1-33</i>		Bozsik Anikó
7-145	<i>S. japonicus ura1-35</i>		Bozsik Anikó
7-147	<i>S. japonicus ura4-24 myc-30</i>	myc ^{- -} mutáns	Enczi Klára
7-148	<i>ura4-24 myc-31</i>	myc ^{- -} mutáns	Enczi Klára
7-149	<i>S. japonicus lys8-18</i>		Enczi Klára

1.táblázat

Felhasznált törzsek

*Valamennyi *S. pombe* törzs a *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe*, valamennyi *S. japonicus* törzs a *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* varietásokhoz tartozik. myc⁻: a vad típushoz képest gyengült micéliáris növekedést mutató törzs; myc⁺⁺: a vad típushoz képest aktívabb micéliáris növekedést mutató törzs; myc^{- -}: micéliáris növekedésre képtelen törzs.

3.1.2. Fajnevek rövidítései:

***S. japonicus*:** *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*

***S. pombe*:** *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe*

***S. cerevisiae*:** *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.3. Alkalmazott plazmidok

pJK148 (Keeney és Boeke, 1994) *S. pombe leu1* markert tartalmazó integratív plazmid, melyet Dr. Forsburg plazmidgyűjteményeiből rendeltünk meg.

pURN18 (Barbet és tsi., 1992) *S. pombe ura4* markert tartalmaz.

pBG1 (Grallert és tsi., 1993) Hygromycin rezisztenciát kódoló gent tartalmaz.

pJDB207 (Beach és Nurse, 1981) *S. cerevisiae LEU2* markert tartalmaz.

pEVP11 (Russel és Nurse, 1986) *S. cerevisiae LEU2* markert és geneticin rezisztenciát kódoló gent tartalmaz.

pBEJ16 (Hadfield és tsi., 1989) *S. cerevisiae LEU2* markert és geneticin rezisztenciát kódoló gent tartalmaz.

pCUT1-9 (Uzawa és tsi, 1990) A *cut1* gén teljes ORF-ét tartalmazó plazmid, melyet Japánból, M. Yanagida-tól kértünk el.

pSPIN11A (Ingavale és tsi., 2000) Az *INO1* (inozitol önálló előállítására képessé tevő) gén (ABE 608) ORF-jét tartalmazza. Indiából, Anand K. Bachhawat -tól kértük el.

3.1.4. Alkalmazott tápközegek

Komplett tápközegek:

YEL (Yeast Extract Liquid): Folyékony komplett tápközeg (Sipiczki és Ferenczy 1977). Élesztőkivonatot és glükózt tartalmaz. Minden tápanyag, faktor, vitamin, nyomelem, aminosav és bázis megtalálható benne, ami az élesztők növekedéséhez szükséges. Az auxotróf mutánsok is szaporodnak benne.

YEA (Yeast Extract Agar): Szilárd komplett táptalaj. YEL + 2%-os agar. 5 mg/100 ml tiaminnal egészítjük ki a hifák kedvezőbb növekedéséhez.

Minimál tápközegek:

SMA (Salt Minimal Agar): (Sipiczki és Frerency, 1977). Nem tartalmazza a nem esszenciális aminosavakat és bázisokat (tehát azok az anyagok nincsenek benne, melyeket az élesztő fiziológiásan önmaga elő tud állítani). Auxotróf mutánsok nem nőnek rajta - ezért számukra restriktív táptalajként viselkedik – csak akkor, ha kiegészítjük azokkal az anyagokkal amelyekre auxotrófiát mutatnak.

szSMA : 1,2M-os szorbittal kiegészített SMA táptalaj. Protoplaszt fúzióhoz használtuk.

EMML : (Mitchinson, 1970) Molekuláris munkák (genomiális DNS izolálás, plazmid izolálás) tenyésztéséhez alkalmaztuk.

EMMA : EMML + 2%-os agar. Transzformáláshoz használt minimál táptalaj. Geneticinnel kiegészített formája az EMMA+g, hygromycinnel kiegészített formája pedig EMMA+h.

MB: (Maniatis és tsi., 1982) Transzformálások tenyésztéséhez használt folyékony tápközeg.

Spóráztató táptalaj:

EMMA-N: Módosított EMMA táptalaj (5%-os glükózzal és NH_4Cl nélkül). Mi dolgoztuk ki a *S. japonicus* ideális spórászási körülményeihez igazítva.

3.2. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

3.2.1. Mutánsok izolálása

Auxotróf mutánsok izolálása

Auxotróf mutánsokat a vad típusú 7.1-es *S. japonicus* törzsből izoláltunk kétféle módszerrel: UV besugárzással és kémiai mutagén ágenssel (nitrozoguanidinnel).

--UV mutagenézis:

Exponenciális szaporodási fázisú, YEL-ben nevelt tenyészet sejtjeiből YEA táptalajra szélesztettünk csészénként 10^3 darabot. Ezeket a sejteket 254 nm-es UV fénnel, Cole-Parmer 9815 lámpával kb. 20 cm-es besugárzási távolságról mutagenizáltuk a 10%-os túlélést adó besugárzási dózissal (esetünkben 27"-es besugárzási idő). Az 5-6 nap után kinőtt telepeket minimál táptalajra (SMA) replikáztuk. A nem növekvő auxotrófokat kiválogattuk, auxotrófiájukat papírkorongos módszerrel meghatároztuk: minimál táptalajra az egyes mutánsokból sűrű pázsitot öntöttünk, majd beszikkadás után aminosavak ill. szerves bázisok oldatába mártott szűrőpapírkorongokat helyeztünk egyenlő távolságra a táptalaj felszínére. Amelyik korong körül 30°C -on 3-4 nap elteltével növekedést tapasztaltunk, arra az adalékra volt a törzs auxotróf. A mutánsokat a leggyakrabban használt 6 különböző anyagra (uracil, leucin, adenin, hisztidin, lizin, arginin) teszteltük.

--Kémiai mutagenézis:

Exponenciális szaporodási fázisú, YEL-ben nevelt sejtekből álló (kb. 10^6 - 10^7 sejt/ml) 800 μl tenyészethez 200 μl 4mg/ml koncentrációjú nitrozoguanidint (NG) adtunk, 10'-ig állni hagytuk a tenyészetet szobahőmérsékleten, majd YEA táptalajra kiszélesztettünk 800db sejt/csésze-nyi mintákat. Auxotróf mutánsokra a fent említett módon szelektáltunk.

Az ura^- mutánsok kereséséhez NG kezelés után 5-FOA (5'- fluoroorotát)-val mutánsdúsítást is alkalmaztunk egyes esetekben: a mutagenizált sejteket 2×10^4 /csésze koncentrációban 0,1 mg/ml FOA-t tartalmazó, uracillal kiegészített SMA táptalajra szélesztettük. A FOA azért alkalmas erre a feladatra, mert az uracilszintézis egyik köztermékével (az orotáttal) analóg szerkezetű, így bekapcsolódva ebbe a bioszintetikus útba toxikus származéka keletkezik. A uracilra auxotróf törzsekben pontosan az a bioszintetikus enzim (orotidin-5'-foszfát dekarboxiláz) hiányzik, mely a 5-FOA-t mérgező fluorouridin 5'-foszfáttá alakítja. A 5-FOA hatásának növelése érdekében a táptalajban a N forrást prolinnal helyettesítettük (McCusker és tsi., 1991).

Hifaképzésben sérült mutánsok (myc) izolálása

Tiaminnal kiegészített YEA táptalajon egy-egy csíkot húztunk sugárirányban a fentiek szerint izolált auxotróf mutánsok dimorfizmusának tesztelésére. Kontrollként leoltottuk a 7-1 vad típusú törzset is. 7 nap után (30°C) vizsgáltuk a hifa növekedésének mértékét. Olyan törzseket kerestünk, melyek hifaképzése a vad típusétól eltért: annál hosszabb hifákat hépzett (myc^{++}), vagy rövidebb,

gyengébb hifákat képzett (myc^-), illetve egyáltalán nem képzett hifát (myc^{--}) (16. ábra). A hifaképzésben nem mutáns auxotróf törzsek közül néhányat újabb UV mutagenézisnek vetettünk alá és olyan mutánsokat kerestünk, melyek myc^{--} vagy myc^{++} tulajdonságokat mutattak és megtartották auxotrófiájukat.

3.2.2. Rekombinációs gyakoriság mérése:

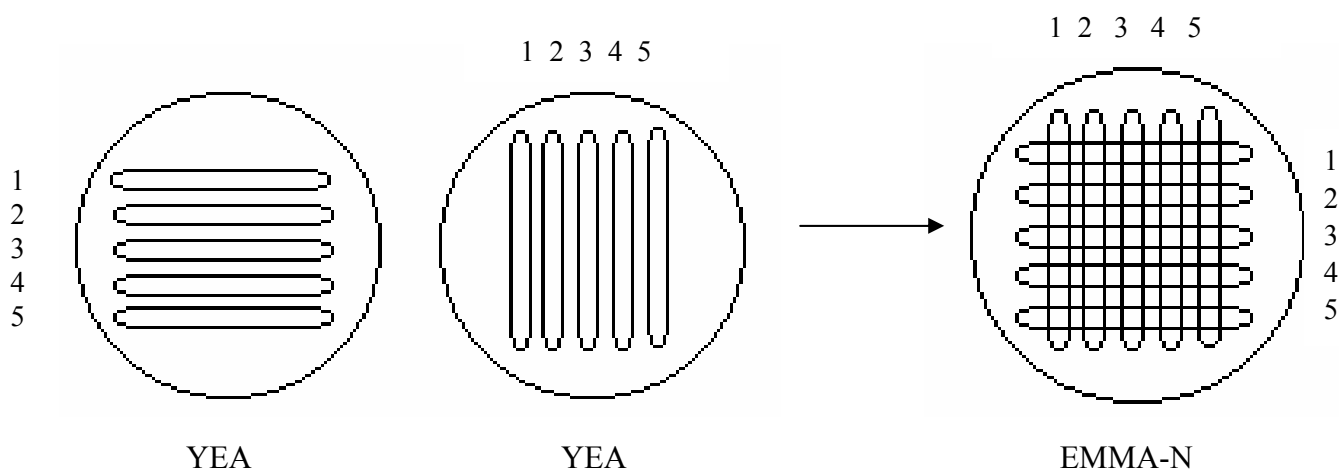
Munkánk során számos alkalommal mértünk rekombinációs gyakoriságot olyan törzsek meiotikus termékéből, melyek többszörösen mutáns háttérrel rendelkeztek. A sok mutáció miatt gyakran a *S. japonicus* aszkuszaira jellemző nyolc spórából csak kevesebb számú (4-7) életképes utódot kaptunk. Ha az ezekből származó adatokat random spóraanalízissel dolgozzuk fel hamis eredményre vezethet, hiszen előfordulhat, hogy a spórák szelektíven pusztulnak, azaz a mutáns szülői tulajdonságokkal rendelkező spórák kisebb eséllyel csíráznak ki mint a vad típusú rekombinánsok. Hasonlóképpen félrevezető adatot kaphatunk, ha csak a telepet képző teljes oktádokkal számolunk, mivel ilyenkor a csonka oktádokból származó sok adat kiesik. Köztes megoldást választottunk ezért: azt vettük alapul, hogy a meiózis profázisában a két-két homológ kromatida között összesen két, rekombináns elrendezést eredményező esemény történhet (NPD = non-parental ditípus). Az olyan oktádoknál tehát, ahol mind a 8 spóra fenotípusát ki lehetett kalkulálni az oktádok számát megszoroztuk kettővel (mindkét rekombinációs eseményt ismerjük), ahol csak 4 spóráról tudtunk információt, ott a csonka oktádok számát csak egyszeresen vettük (csak egy rekombinációs eseményről tudunk információt). Ezeket a számokat összeadva megkaptuk a meiózis során történt, értékelhető rekombinációs események számát ($Re = \text{rekombination events}$). Megnéztük, ezen események közül hány eredményezett rekombináns génelrendeződést ($Ro = \text{recombinant organization}$). A rekombinációs gyakoriságot ($Rf = \text{recombination frequency}$) pedig így számoltuk: $Rf = Ro / Re \times 100$.

Kapcsoltság keresése:

Kiszámítottuk a rekombinációs gyakoriságot (Rf) az egyes auxotróf törzsek keresztezéséből származó adatokból. Ha az $Rf \sim 50\%$ -nak adódott, akkor a vizsgált markerek között nincs kapcsoltság, ha az érték ennél kisebb, a két markerlókus az a kromoszómán helyileg közel van egymáshoz, tehát közöttük az Rf értékével fordítottan arányos mértékű kapcsoltság van (minél kisebb az Rf érték, annál nagyobb a kapcsoltság).

3.2.3. Auxotróf mutánsok csoportosítása

Az azonos auxotrófiájú mutánsokat csoportokba rendeztük aszerint, hogy azonos, vagy különböző lókuszban történt-e bennük a mutáció. A csoportosítás azon alapult, hogy diploidokat hoztunk létre haploid auxotrófokból és néztük a diploidok fenotípusát. Amennyiben a diploid is auxotróf volt, akkor a haploid auxotrófok azonos génben szenvedtek mutációt. Ha a diploid prototróf volt, akkor a haploidok mutációi eltérő génekben helyezkedtek el. Ebben az esetben a haploidok prototróffá egészítették, azaz komplementálták egymást (komplementációs teszt). A hibrideket protoplaszt fúzióval hoztuk létre (lásd később). A faj rövid diploid állapota miatt (lásd: irodalmi áttekintés) azonban a valódi komplementáció tesztelése nehézkesnek bizonyult. Ezért az allélikusság vizsgálatánál inkább a meiotikus rekombinációt vettük segítségül. A rekombinációra épülő tesztelés során az egyes auxotróf törzsekkel spóráztató táptalajon keresztezési mátrixot végeztünk, azaz mindegyik törzsből vastag csíkot húztunk YEA táptalajra majd kinövekedésük után egymásra merőlegesen replikáztuk őket EMMA-N spóráztató táptalajra, így módon minden törzset kereszteztünk minden másik törzsszel (3. ábra).



3. ábra

Keresztezési mátrix

Spóráképzés után (3-4 nap 30 °C-on) SMA táptalajra replikáztunk. 7 nap után értékeltünk: ahol a keresztezési pontokban egyértelmű növekedést kaptunk (10. ábra), ott a két törzs meiotikus rekombináció révén gyakran képezhetett prototróf rekombinánsokat, tehát különböző lókuszban sérültek voltak, így különböző csoportba soroltuk. Ahol nem kaptunk növekedést, illetve a telepek száma az intragénes rekombinációs gyakoriság értéke (10^{-5}) alatt maradt (egy keresztezési pontban csak néhány telepet kaptunk), ott az egymást keresztező két törzs azonos lókuszban sérült tehát azonos csoportba soroltuk.

Allélszegregáció vizsgálata októadanalízissel

Különböző auxotrófiájú törzsekkel protoplaszt fúzió segítségével diploidokat képeztem és azokat spóráztató táptalajra (EMMA-N) tettem. Az így kapott, úgynevezett azigotikus aszkuszokból (12. ábra) mikromanipulációval a spórákat elkülönítettem és meghatároztam a spórákból felnövekvő telepek auxotrófiáját.

3.2.4 Az egyes auxotróf csoportok helyének meghatározása a bioszintetikus útvonalakban

Az egyes auxotróf mutáns csoportok helyét akartuk felderíteni a megfelelő bioszintetikus útvonalakban.

A *S. pombe* bioszintetikus útvonalait figyelembe véve (az aminosavsintézis enzimatisz folyamatata meglehetős konzervativitást mutat az élővilágban) igyekeztünk az egyes szintetikus útvonalakban szereplő lehető legtöbb köztiterméket a SIGMA-tól beszerezni és az egyes mutáns csoportokat ezekkel tesztelni. Az uracil auxotróf mutánsoknál ureidoszukcinátot, dihidroorotátot, orotátot uridin 5'-monofoszfátot, a lizin auxotróf mutánsoknál alfa-ketoadipinsavat, α -amino-adipinsavat homocitromsavat, az arginin auxotróf mutánsoknál glutamint, glutamátot, ornitint, N-acetil glutaminsavat, citrullint, az adenin auxotróf mutánsoknál 5-aminoimidazol karboxamid ribonukleotidot, adenzin monofoszfát szukcinátot, inozitol-5' monofoszfátot teszteltünk. Ennek érdekében minimál táptalajra szélesztettünk 100 μ l-t az egyes köztitermékek 10 mg/ml-es oldatából, majd a táptalaj felületének szikkadása után replikáztuk a táptalajokra a megfelelő auxotróf törzseket. 5 nap után vizsgáltuk a növekedést: ahol növekedést tapasztaltunk, feltételeztük, hogy az adott mutáns törzs az alkalmazott köztitermék előtti enzimek valamelyikében volt hibás, így átugorhatta a mutációval sújtott lépést. Míg a nem növekvő telepek az adott köztitermék utáni folyamatsor egyik enzimében lehettek mutánsak, így a hibás lépést a köztitermék felvételével sem kerülhették ki.

3.2.5 Protoplaszt fúzió

A különböző auxotrófiájú törzsek hibridizálását protoplaszt fúzióval végeztük (Sipiczki és tsi., 1985). Az egyes törzsek exponenciális szaporodási fázisban levő sejtjeit 2 mg/ml koncentrációban alkalmazott, sejtfolat oldó Lysing enzimmel (SIGMA) protoplasztáljuk izotóniás körülmények közt (0,65 M-os KCl-ben) 37 °C-on. Ezt követően 1,2 M-os szorbitban történő mosás után az izotóniás körülményeket biztosító szorbitoldatban a fuzionálni kívánt két törzset összeöntjük, együtt lecentrifugáljuk, a csapadékot 30%-os PEG6000 és 0,1M-os CaCl_2 9:1 arányú keverékében felszuszpendáljuk és 20'-ig szobahőmérsékleten állni hagyva azokat fúzióra készítetjük. Az így kezelt szuszpenziót szorbitos minimáltáptalajra (szSMA) visszük ki. 30 °C-on 7-10 nap után

kapunk telepnövekedést. A kinövekvő telepek csak a két különböző auxotrófiájú törzsből származó diploidok lehetnek, mivel komplementáció révén fenotípusosan csak ezek a sejtek prototrófok.

3.2.6. Koffein-és benomylérzékenység vizsgálata:

Koffeinérzékenység tesztelése:

A myc mutáns törzseken az ezen citotoxikus anyaggal szembeni érzékenységet vizsgáltunk.

Növekvő koffeinkoncentrációt (0-10 mM) tartalmazó YEA + tiamin táptalajra csík formájában leoltottuk a vizsgálandó törzseket vad típusú törzs (7-1) mint kontroll mellett. 30°C-on történő 7-8 napos növekedés után értékeltük ki: megmértük az egyes törzsek által fejlesztett micéliumok hosszát, illetve a micéliáris növekedést teljesen gátló koncentrációknál az egysejtű élesztősejtek növekedésének mértékét figyeltük.

Koffeinrezisztens mutánsok izolálása:

UV-mutagenízisnek (lásd feljebb) vetettük alá a vad típusú (7-1) törzset és rezisztens telepeket izoláltunk: 5mM koffeinkoncentrációt tartalmazó YEA + tiamin táptalajra szélesztettük az UV-vel mutagenizált sejteket 10^2 sejt/csésze sűrűséggel. Az így kapott telepek közül izoláltunk olyan koffeinrezisztens mutánsokat, melyek képesek voltak hifaképzésre. A 10 mM koffeinkoncentrációt tartalmazó YEA táptalajra UV kezelés után 10^6 sejt/sűrűséggel szélesztettünk. A kinövő koffeinrezisztens mutánsokat izoláltuk.

Benomylérzékenység tesztelése:

Növekvő benomyl-koncentrációjú (8-16 µg/ml) táptalajra replikáztuk át a különböző myc mutáns törzseket majd 30 °C-on történő 3-4 napos növekedés után az élesztősejtek növekedésének mértékét vizsgáltuk a 7-1 vad típusú törzs, mint kontroll mellett.

Benomylrezisztens mutánsok izolálása:

A vegetatív sejtekre toxikus koncentrációjú (12 mM) benomylt tartalmazó YEA-ra szélesztettünk UV-mutagenizált (lásd feljebb) sejteket 10^5 sejt/csésze sűrűséggel. A kinövekvő (benomyl-rezisztens) telepeket izoláltuk. Ezek hifanövevesztési készségét néztük egyre növekvő benomyl-koncentrációk (4 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml) mellett.

3.2.7. Pulzáló erőterű gélelektroforézis

A *S. japonicus* kromoszómáinak gélelektroforézissel történő elválasztását oktagonális elektróda-elrendezésű, homogén erőteret létrehozó CHEF-DRII készülékkel végeztük.

Mintaelőkészítés: Stacioner fázisú sejteket 3x mosunk 0,05 M-os EDTA-val, CPES pufferben (0,05M EDTA + 0,1 M pH=5,6 citrát-foszfát puffer + 1,2 M szorbit) felvesszük a csapadékot és hozzáadunk 2 mg/ml Zymolyase enzimet (ICN), majd 37°C-on tartjuk szferoplasztálódásig (30'-40'). 5×10^9 szferoplasztot felveszünk 1 ml CPES-ben és hígítási sort készítünk háromszor felére hígítva ezt a koncentrációt. 1V/V 1%-os 45 °C-os Low Melting Agarose-sal (SIGMA) a sejteket dugóöntőformába töltjük, 1-2 h-ig hűtőben tartjuk, míg a dugók megszilárdulnak. A dugókat egyenként 1 ml 0,5 M-os EDTA-ban 30'-ig jégen állni hagyjuk, majd 1,5 ml ESP-ben (5 ml 0,5M-os EDTA + 50 mg Na-lauril-szarkozil + 500 µl Proteináz K (SIGMA)) felvesszük és 6-8 órára 37°C-ra tesszük. A dugókat felhasználásig 0,5M-os EDTA-ban tároljuk 4°C-on.

Elektroforézis: 0,5x-es TBE pufferrel készült 0,8 %-os agarózgél (BioRad) fésűlyukaiba illesztjük a dugókat és a 2. táblázatban megadott paraméterekkel 5-6 napon át 11°C-os hűtés mellett 0,5 %-os TBE pufferben futtatjuk.

agarózgél	0,5-0,8 %
puffer	1x TBE
hőmérséklet	11 °C
feszültség	1,5-2,5 V/cm (50 V)
pulzusidő	10-60 min
futtatási idő	144 h
erőterek szöge	106°

	1. blokk	2. blokk	3. blokk
kezdő idő	5,5 t	4,7 t	4,0 t
befejező idő	5,5 t	4,7 t	4,0 t
futási idő	72 h	48 h	24 h
erőterek szöge	106°	106°	106°
Feszültség	1,5 V/cm	1,5 V/cm	1,5 V/cm

2. táblázat

A pulzáló erőterű gélelektroforézis paraméterei. t = 1000 másodperc

3.2.8. Mikroszkopizálás

A mikroszkópos felvételeket az Olympus BH-2 mikroszkóppal összekötött fényképezőgéppel hoztuk létre. A térhatású képeket (DIC) Nomarski objektív segítségével fényképeztük.

Fluoreszcens festések:

A sejtmagok nukleinsavát a sejtek 70%-os etanollal történt fixálása után DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) fluoreszcens festékekkel festettük. A vakuólumokat a Hollandiából, a Molecular Probes cégtől rendelt vacuole staining kit component B (7-amino-4-klorometilkumarin) fluoreszcens festékével jelöltük a kit-hez megadott festési eljárással. A fluoreszcens festést az Olympus BH-2 mikroszkóp 100x-os nagyítású UV objektíve alatt vizsgálva jelenítettük meg.

3.2.9. Molekuláris módszerek

A DNS-sel végzett műveletek (DNS izolálás, tisztítás, rekombináns DNS technikák) módszereit Sambrook és tsi. (1989) leírása alapján végeztük.

Transzformálás: A *S. japonicus* transzformálásához lítium-acetátos (Okazaki és tsi., 1990) és szferoplasztos transzformálást (Sipiczki és tsi., 1985) illetve elektroporézist alkalmaztunk. Mindegyik transzformációs módszer során OD=0,2-0,4 denzitású exponenciális fázisú sejteket transzformáltunk. 100 µl sejtuszuspenzióhoz 5µl DNS-t adtunk. A transzformálások után szélesztés előtt YEL-ben forgattuk a sejteket 60'-ig. EMMA táptalajra szélesztettünk, csészénként 2×10^4 számú sejtet. Minden esetben alkalmaztunk negatív kontrollt (DNS-t nem tettünk a sejtekhez) és pozitív kontrollként megfelelő *S. pombe* törzseket. A geneticin rezisztenciát tartalmazó plazmiddal való transzformálások után a *S. pombe* sejteket 50 µg/ml, a *S. japonicus* sejteket 100 µg/ml geneticint (SIGMA) tartalmazó EMMA (EMMA+g) táptalajra, a hygromycin-rezisztenciát tartalmazó plazmiddal való transzformálások után pedig a *S. pombe* sejteket 40 µg/ml, a *S. japonicus* sejteket 110 µg/ml hygromycint (SIGMA) tartalmazó EMMA (EMMA+h) táptalajra szélesztettük.

Plazmidvesztés vizsgálata: (Heyer és tsi., 1986). A transzformáns sejteket YEL-ben tenyésztettük 24h-ig 30 °C-on. Ezekből egyenlő számú sejtet szélesztettünk minimál (restriktív) és komplett (permisszív) táptalajra. Meghatároztuk a kétféle táptalajon kinőtt sejtek arányát és ebből számítottuk a plazmidvesztés mértékét, melyet %-os értékben is kifejeztük (minimálon kinőtt sejtek száma / komplett táptalajon kinőtt sejtek száma x 100). Ha ez az érték 100%, plazmidvesztés nincs, a transzformáns klón valószínűleg integráns, azaz a bejutott DNS a kromoszómába integrálódott.

Génkönyvtár készítése: Teljes genomi DNS-t izoláltunk 7-1 *S. japonicus*-ból (Alpha és tsi., 1993), majd részlegesen emésztettük EcoRI enzimmel. A pJK148 (*S. pombe leu1* markert tartalmazó) intergratív plazmidot is hasítottuk EcoRI-gyel majd a genomiális fragmentekkel összeligáltuk. Ezzel *Eschericia coli DH5α* sejteket transzformáltunk és α-komplementáció segítségével (Sambrook, 1989) kiválogattuk az inzertet tartalmazó (ezért fehér színű) pJK148 vektorokat tartalmazó telepeket. A baktériumsejtekből visszanyertük a plazmidokat.

Autonóm módon replikálódó szekvencia (ARS) keresése: A *S. japonicus* génkönyvtárral transzformáltunk *S. japonicus* leucin auxotróf mutánsokat (leu^-) és leu^+ telepekre szelektáltunk. A 7-65-ös leu^- törzs transzformálásakor kaptunk leu^+ telepeket. Minden leu^+ telep plazmidvesztését teszteltük. A plazmidvesztést mutató telepekből visszanyertük a plazmidot Gene Clean II kit alkalmazásával (BIO 101) a kitben megadott recept alapján. A visszanyert plazmid által

tartalmazott genomiális inzertet szubklónoztuk, azaz kisebb darabjait pJK148 plazmidba téve azokkal ismét transzformáltuk a *S. japonicus* 7-65 törzset. A legkisebb olyan szakaszt kerestük, melyet tartalmazó plazmiddal való transzformáláskor még kaptunk plazmidvesztést mutató klónokat. E szakasz szekvenciáját meghatároztuk.

Szekvenálás és szekvencia-analízis: A szekvenálás automata ABI PRISM (Model Version 2.1.0) szekvenátorral történt az SZBK szolgáltató laborjának segítségével. A kapott szekvencia számítógépes analízisét az OMIGA1.1 szoftver csomag (Oxford Molecular Group) segítségével végeztük. A filogenetikai összehasonlításokhoz a KITSCH -- Fitch-Margoliash és Least Squares módszert használtuk, Joseph Felsenstein (University of Washington) által rendelkezésünkre bocsájtott Phylip programcsomagból.

Homológia keresés: A nukleinsav- és aminosavszekvenciákhoz számítógéppel kerestünk homológiákat. Az NCBI adatállományában (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) történő szekvencia-hasonlóság keresést a BLAST (Altschul és tsi., 1990) internetes szolgáltatással végeztük.

Southern blot: (Maniatis és tsi., 1982). A plazmidvesztést nem mutató telepekből teljes genomi DNS-t vontunk ki (Alpha és tsi., 1993), 10µg-ot meghasítottunk PstI és HindIII restrikciós enzimekkel majd futtatás után blottoltuk pozitív töltésű nylon membránra. A pJK148 plazmid bakteriális szakaszából származó próbával hibridizáltattuk a membránt. E próba előállításához a pJK148 plazmidot PstI-SspI kettős restrikciós enzimes emésztésnek vetettük alá majd agarózgélen megfuttattuk. A plazmid bakteriális eredetű részéből a 700 bp hosszúságú PstI-SspI szakaszt izoláltuk, tisztítottuk és megjelöltük a random primer DIG jelölő technikával. A jelölést, a hibridizációt és a detektálást a Roche Biochemicals cég labelling DIG jelölő és detektáló kittel végeztük (DIG High Prime Labeling and Detection Kit II).

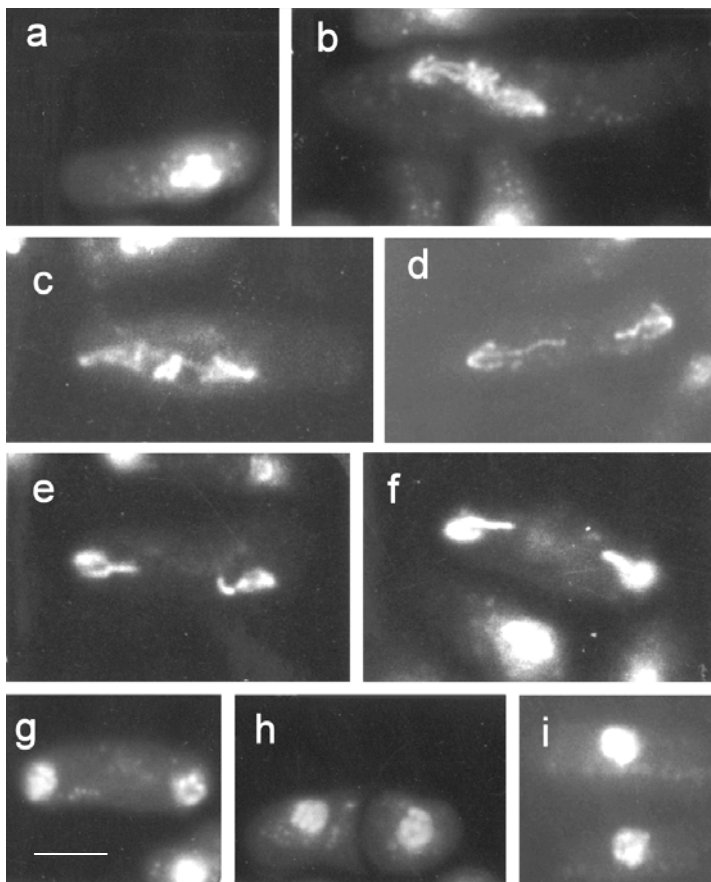
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. EREDMÉNYEK

4.1.1. Az élesztősejtek és a hifák mitózisának összehasonlítása

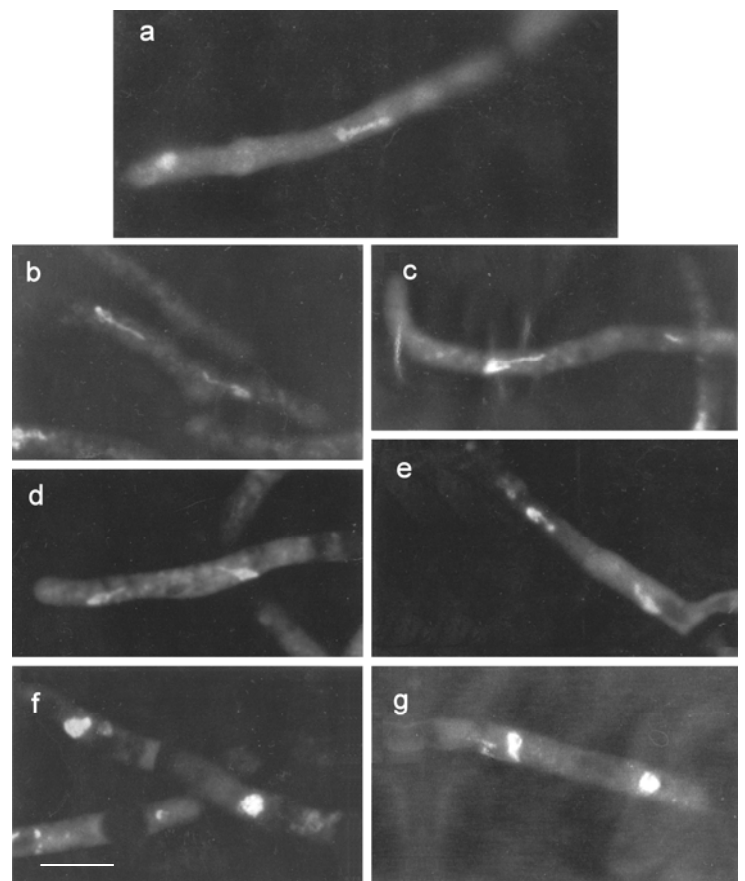
Az egysejtű élesztő és a többsejtű hifa alak közötti citológiai hasonlóságok, különbségek felismerése érdekében különböző mikroszkópos vizsgálatoknak vetettük alá a két megjelenési forma sejtjeit, vizsgáltuk morfológiájukat, sejtszerkezetüket, fluoreszcens festéssel láthatóvá tettük a bennük levő sejtmagot. A hifák és élesztők aktineloszlását és vakuoláris szerkezetét már vizsgálták (lásd: irodalmi áttekintés).

Fluoreszcens DAPI festékkel megfestettük az élesztő- és hifasejteket a 7-1-es vad törzsnél (lásd: anyagok és módszerek), majd UV mikroszkóp alatt nyomunköveltük a mitózis egyes fázisait és összehasonlítottuk a két alakban kapott megfigyeléseket. A magosztódás főbb lépései azonosak voltak a két alakban (4. és 5. ábra).



4. ábra

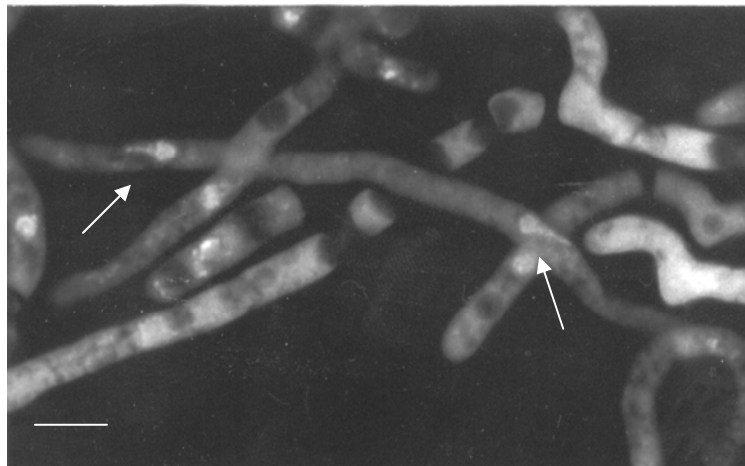
Élesztősejtek mitózisa kronológiai sorrendben
(DAPI festéssel) Méretvonal: 5 μ m



5. ábra

Hifasejtek mitózisa kronológiai sorrendben
(DAPI festéssel) Méretvonal: 10 μ m

A hifák esetében azonban a szétválás után a két új mag ellentétes irányba, a két új sejt végei felé mozogva a mozgás irányába nyúlik meg, mintha a sejt citoszkeletális hálózata „húzná” őket (6. ábra). Ilyesfajta ellentétes irányú kicsúcsosodást élesztőalak esetén nem észleltünk. Ez a torzító hatás tehát valószínűleg a hifasejt intenzív megnyúlásának tulajdonítható.

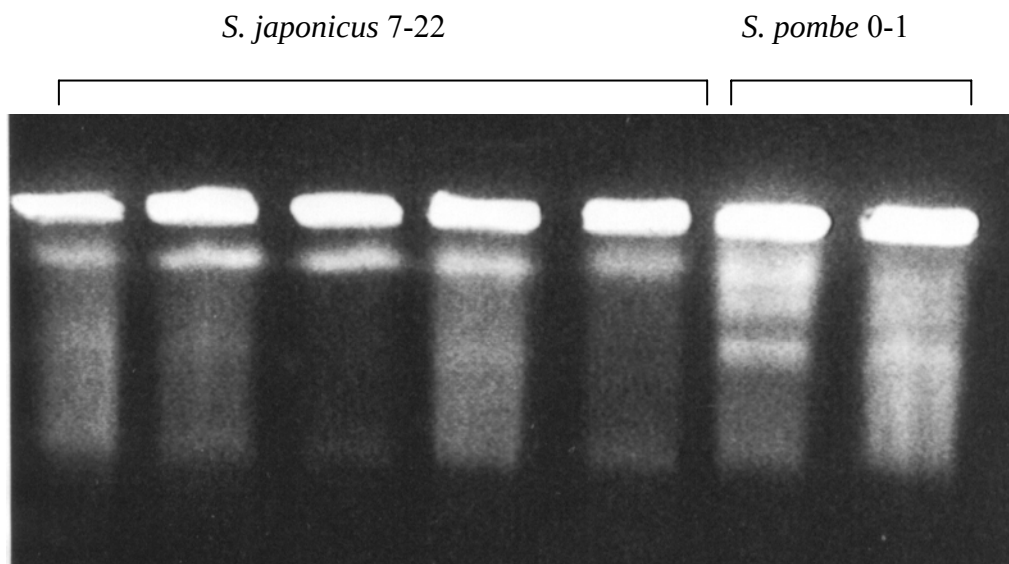


6. ábra

Az élesztősejtek ellentétes irányú kicsúcsosodása a hifák osztódásának terminális fázisában. Méretvonal: 10 μ m

4.1.2. Elektroforetikus kariotipizálás

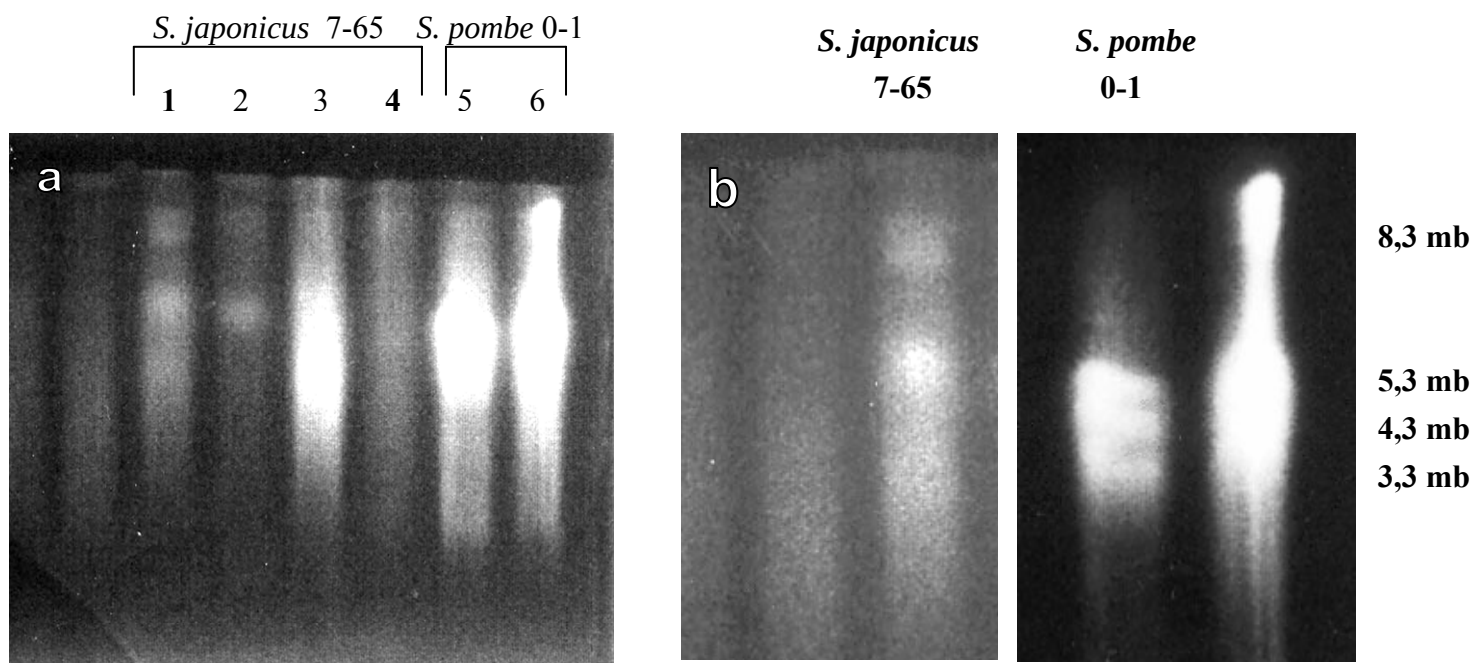
A fluoreszcens magfestés során 3 db hosszú kromoszómát észleltünk a *S. japonicus*ban mikroszkóposan (4. ábra d/ kép). Erre az eredményre szeretnénk volna pulzáló erőterű gélelektroforézissel is ráerősíteni. Ehhez a CHEF-DRII berendezést alkalmaztuk (lásd: anyagok és módszerek). A *S. japonicus* 7-1-es, 7-22-es és 7-65-ös típustörzsek kromoszómáit vizsgáltuk. Kontrollként a *S. pombe* L 972 0-1 törzsét alkalmaztuk. A *S. japonicus* igen nehezen kezelhetőnek, érzékenynek bizonyult: míg a *S. pombe* 3 kromoszómája mindig szépen kirajzolódott futtatás után a gélen, addig a *S. japonicus*nál számtalan elektroforézisből csak néhány esetben tudtuk láthatóvá tenni a kromoszómákat, de még ezekben az esetekben is csak halványan kivehető csíkokat kaptunk (7. és 8. ábra). A 7-1-es törzs esetén soha nem sikerült sávokat látnunk, a 7-22 és 7-65-ös vad típusú törzsekkel több sikert értünk el, ezért a későbbiekben csak ezeket vizsgáltuk.



7. ábra

S. japonicus és *S. pombe* törzsek elektroforetikus kariogramjai

Jól látható a kontrollként alkalmazott *pombe* 3 kromoszomája, a *S. japonicus*-nál azonban csak 2 jól elkülönülő sávot tudunk megkülönböztetni.



8. ábra

S. japonicus és *S. pombe* törzsek elektroforetikus kariogramjai

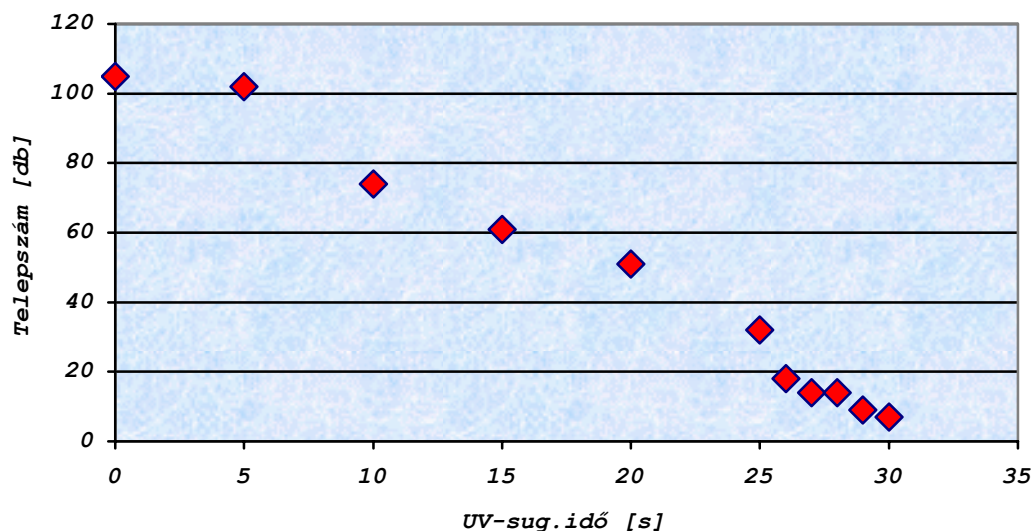
A futtatási idő 5-ről 7 napra történő növelésével kirajzolódik a *S. japonicus* harmadik kromoszómája is ~8,3 mb-os mérettartományban. Mivel a sávok intenzitása eltérő volt, kétféle megvilágítási erősséggel kellett fényképezni ugyanazt a gélt (a), hogy a *S. japonicus* és a kontroll *S. pombe* kromoszómái is látsszanak. Ezért a két kép megfelelő részleteit egymás mellé helyeztük (b), ahol az 1-es és 4-es számú sávokat emeltük ki.

A 7. ábrán látható hogy a kontrollként alkalmazott *S. pombe* három kromoszómájának sávja tisztán kirajzolódik, a *S. japonicus* esetében azonban itt csak két sávot kaptunk. A futtatási idő 5 napról 7 napra történő növelésekor azonban kaptunk olyan kariogramokat (8. ábra), melyeken nagyobb mérettartományban a *S. japonicus*-nál egy harmadik sáv is kirajzolódott: egy a *S. pombe* legkisebb kromoszómájának (3,3 mb), másik a *S. pombe* legnagyobb kromoszómájának (5,3 mb) mérettartományában, a harmadik pedig egy jóval nagyobb (kb. 8,3 mb) mérettartományban.

4.1.3. Auxotróf mutánsok izolálása

Ahhoz, hogy a *S. japonicus*-t genetikai vizsgálatokhoz felhasználjuk, szükséges volt, hogy jól követhető, egyszerűen detektálható genetikai markereket hozzunk létre. Ennek a követelménynek legjobban az **auxotróf** mutációk felelnek meg, melyek valamely aminosav vagy bázis előállítási folyamatában sérültek, így azokat a tápközegből kell felvenniük. Ezek a mutánsok minimál táptalajon, mely nem tartalmazza ezeket az anyagokat, nem növekednek.

Mivel a *S. japonicus* egy teljesen új, még kevésbé alkalmazott modellszervezet, így korábban izolált auxotróf mutánsok nem álltak rendelkezésünkre, magunknak kellett mutagenézissel ezeket előállítanunk. A vad típusú 7-1 törzsből kémiai mutagenézissel, nitrozoguanidin alkalmazásával vagy az UV fény fizikai roncsoló hatásának felhasználásával auxotróf mutánsokat izoláltunk (lásd: módszerek). Ez utóbbihoz előbb meghatároztuk a *S. japonicus*-ra jellemző irtási görbét (9. ábra) és a 10%-os túlélési értékhez tartozó besugárzási időt alkalmaztuk.



UV-sug.idő [s]	0	5	10	15	20	25	26	27	28	29	30
Telepszám [db]	105	102	74	61	51	32	18	14	14	9	7

9. ábra

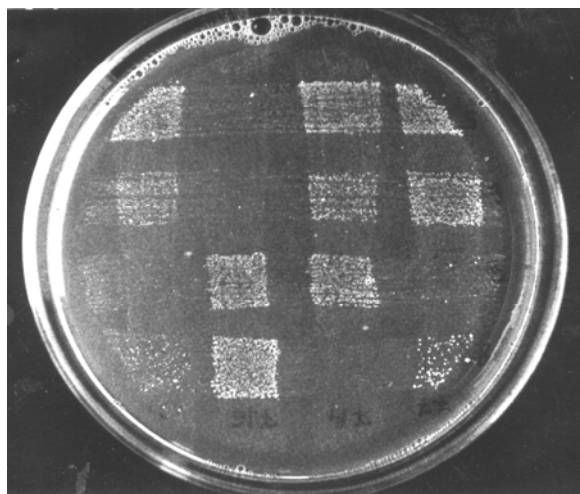
A *S. japonicus* UV irtási görbéje

Az ura^- mutánsokra történő szelek- táláshoz 5'-fluorouracillal (FOA)-val történő szelekciós dúsítást alkalmaztunk (lásd: módszerek).

Összesen 32 db ura^- mutánst , 11 db leu^- , 17 db lys^- , 27 db arg^- , 16 db ade^- mutánst izoláltunk.

4.1.4. Az auxotróf mutánsok csoportosítása

A kapott auxotróf mutánsokat csoportokba rendeztük. Mivel e faj diploid állapota rövid, csak a zigótára korlátozódik (lásd: irodalmi áttekintés) ezért a csoportosításhoz a hagyományos komplementációs teszt helyett rekombináció alapult tesztet alkalmaztunk (10. ábra) (lásd: anyagok és módszerek). SMA táptalajon a keresztezési pontokban növekedést látunk ott, ahol különböző génben sérült auxotróf törzsek érintkeztek és konjugáltak, mivel meiotikus rekombinációval prototróf rekombináns spórákat hoztak létre. Ahol nem látunk növekedést a keresztezési pontokban, ott a törzsek azonos génben elhelyezkedő auxotróf mutációt hordoztak.



10. ábra
A rekombináció alapult teszt.

Az azonos génben sérült törzsek egy csoportba kerültek, így a beazonosított csoportok száma a talált gének számát jelöli az egyes auxotrófiák esetén (11. ábra és 3. táblázat).

Auxotrófiák	Izolált törzsek száma	Csoportok száma
adenin ⁻	16	4
uracil ⁻	32	4
leucin ⁻	13	4
lizin ⁻	17	8
arginin ⁻	27	7

3. táblázat
A talált csoportok száma az egyes auxotrófiák esetén

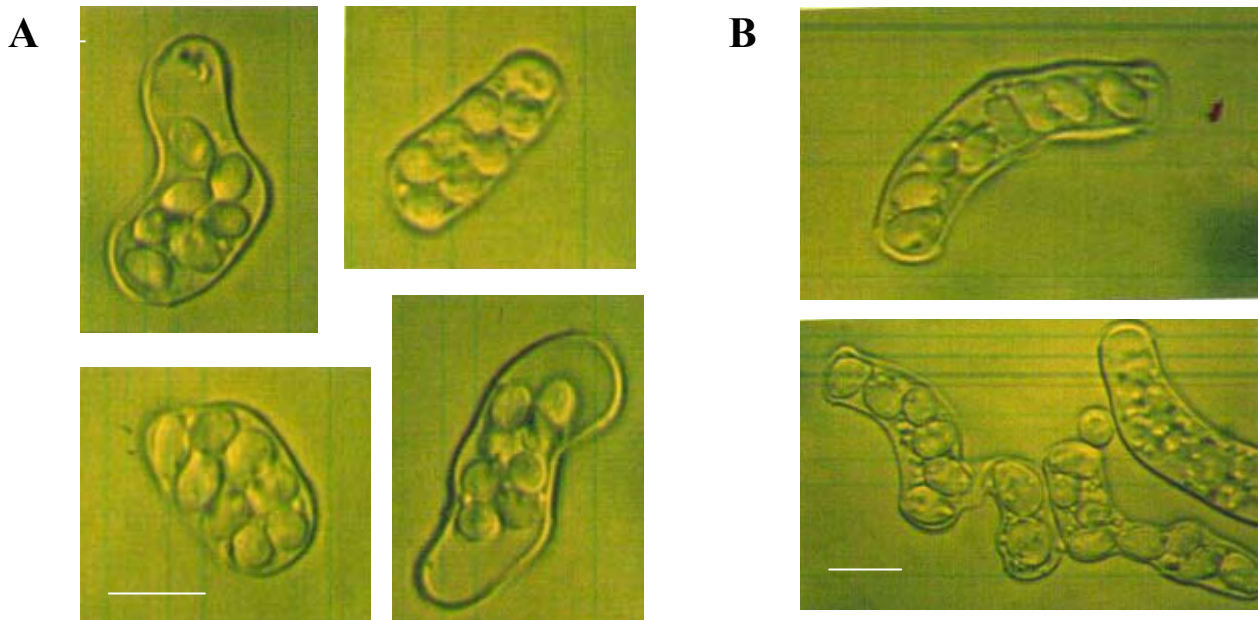
Auxotrófia	Csoportok	Izolált törzsek (törzskönyvi számmal)
URACIL⁻	1. csoport	7-47; 7-48; 7-51; 7-52; 7-55; 7-74; 7-10; 7-143; 7-144; 7-145
	2. csoport	7-49; 7-50; 7-53; 7-54; 7-73; 7-75; 7-16; 7-78; 7-140; 7-141; 7-142
	3. csoport	7-52; 7-14
	4. csoport	7-76; 7-77; 7-79; 7-80; 7-81; 7-82; 7-138; 7-139
LIZIN⁻	1. csoport	7-27; 7-29; 7-106
	2. csoport	7-26; 7-109
	3. csoport	7-30; 7-111
	4. csoport	7-6
	5. csoport	7-104; 7-105; 7-108; 7-110; 7-112
	6. csoport	7-103; 7-113
	7. csoport	7-107
	8. csoport	7-149
ARGININ⁻	1. csoport	7-31; 7-35; 7-40; 7-115; 7-118; 7-121; 7-123
	2. csoport	7-32; 7-37; 7-114
	3. csoport	7-33; 7-36; 7-41; 7-18; 7-119
	4. csoport	7-34; 7-39
	5. csoport	7-38; 7-66; 7-67; 7-68; 7-120
	6. csoport	7-122
	7. csoport	7-116
ADENIN⁻	1. csoport	7-43; 7-13; 7-129; 7-128
	2. csoport	7-44
	3. csoport	7-45; 7-46; 7-130; 7-133; 7-135; 7-136; 7-137
	4. csoport	7-83; 7-131; 7-134
LEUCIN⁻	1. csoport	7-56; 7-62
	2. csoport	7-58; 7-59; 7-124; 7-125; 7-126
	3. csoport	7-60; 7-63
	4. csoport	7-70; 7-57

11. ábra

Az egyes auxotróf törzsek csoportokba rendezése.

4.1.5. Protoplaszt fúzió alkalmazása

A *S. japonicus* homotallikus szervezet (a sejtek egy telepen belül képesek konjugációs partnert találni), ezért törzseinek keresztezéséhez előnyösebb módszer a protoplaszt fúzió alkalmazása, ezáltal kiküszöböljük egy törzsnek az önmagával való keresztezését. A *S. pombe*-ra kidolgozott módszerrel a *S. japonicus*on is sikeresen elvégezhető volt a fúzió (lásd: anyagok és módszerek). Az így létrejövő diploid sejteket N-szegény, spóráztató táptalajra (EMMA-N) téve szabályos zsák alakú **azigotikus** aszkuszokat (12. ábra A) kaptunk, bennük a 8 haploid aszkospórával. Mikro-manipulációval elkülönítve egymástól a spórákat (13. ábra) az azokból felnövekvő telepek **mendeli** módon megoszló markerarányt mutattak. (14. ábra)

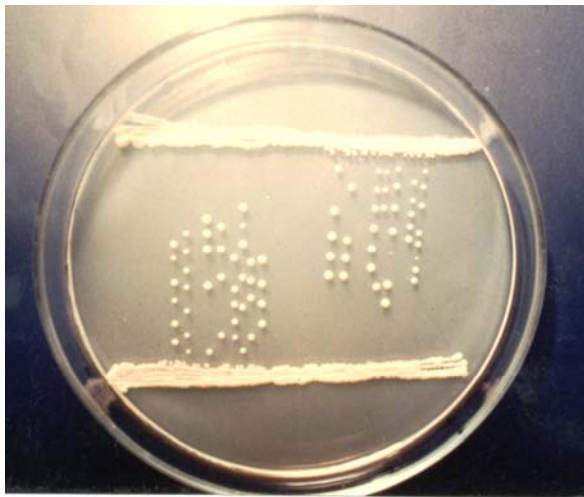


12. ábra

Aszkuszképzés *S. japonicus*ban. Méretvonal: 10 μ m

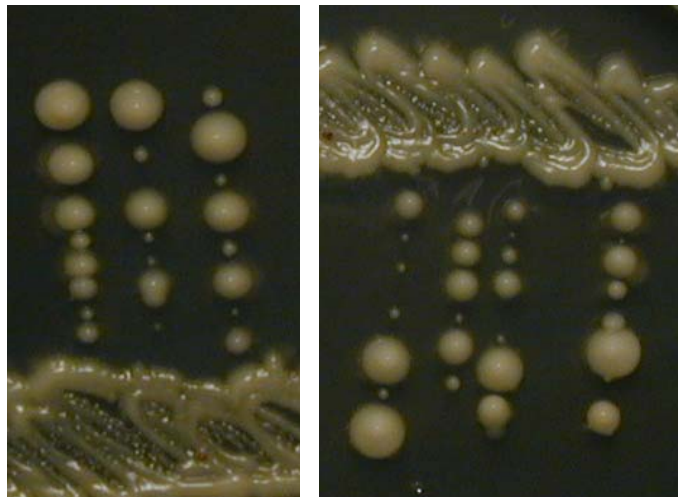
A/ Azigotikus aszkuszok

B/ Zigotikus aszkuszok



13. ábra

Oktádanalízis. Az aszkuszkökből mikromanipulátorral izoláltuk a spórákat, elkülönítettük őket a táptalaj felületén úgy, hogy mindegyikből különálló telep jöjjön létre. Az azonos aszkuszból származó spórák által képzett telepek egy sorban helyezkednek el.



14. ábra

Egy lassú telepnövekedést okozó mutáció mendeli szegregációja

4.1.6. Kettős mutáció kimutatása egy ura^- mutánsban

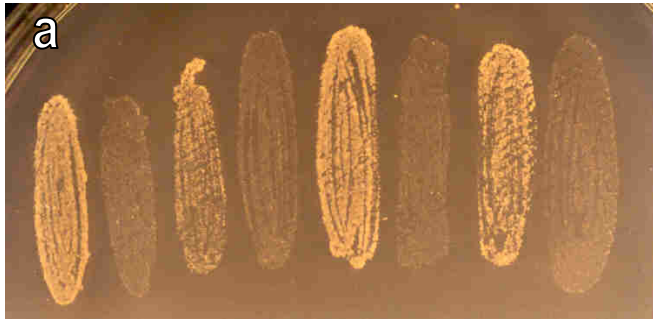
A mutánsok csoportokba rendezésekor találtunk olyan ura^- mutáns törzset (7-52 törzskönyvi számút), melyet az uraciluxotrófok között beazonosított 4 komplementációs csoportból kettőbe, az 1-es és 3-as csoportba is be tudtunk sorolni. Felmerült a gyanú, hogy ez a törzs kettős mutáns, melynek egyik mutáns génje az egyik, másik mutáns génje a másik csoport megfelelő génjével mutat azonosságot. A feltételezés bizonyításához kereszteztük a törzset protopaszt fúziós módszerrel a 7-65 leu^- mutánssal, az azigotikus aszkuszkökből oktádanalízissel elkülönítettük a spórákat és meghatároztuk azok auxotrófiáját. A leu^- marker a mendeli 4:4 megoszlást mutatta az utódspórákban, míg az ura^- mutáció gyakorta mutatott nem mendeli (6:2) eloszlást a mendeli 4:4 mellett (15. ábra). Az eredményt további fúziókkal is megerősítettük:

7-52 $ura-8$ (1. és 3. csoport) x 7-14 $ura3-17$ (3. csoport) nem kaptunk diploidot → azonos csoport

7-52 $ura-8$ (1. és 3. csoport) x 7-47 $ura1-1$ (1-es csoport) nem kaptunk diploidot → azonos csoport

7-52 $ura-8$ (3-as csoport) x 7-76 $ura4-19$ (4-es csoport) életképes diploidot kaptunk → különböző csoport

7-52 *ura-8* (3-as csoport) x 7-79 *ura4-22* (4-es csoport) életképes diploidot kaptunk→
különböző csoport



SMA + uracil táptalajon



SMA + leucin táptalajon

15. ábra

A 7-52 *ura1,3-8* két különböző uracilgénben való mutációjának bizonyítása a
7-52 *ura1,3-8* x 7-56 *leu1-1* keresztezés alapján. Míg a leucinmarker a mendeli 4:4 szegregációt
mutatja (a) addig az uracilmarker gyakorta ad 6:2 megoszlást (b)

4.1.7. Kapcsoltságok az egyes auxotróf gének között

Az egyes auxotrófiákra felállított komplementációs csoportoknál a csoportosítás helyességét protoplaszt fúzióval is megerősítettük, amely módszer már a valódi komplementáció követelményét is kielégíti: a komplementációs csoportok egyes tagjait mesterségesen fuzionáltattuk. A különböző csoportba tartozó törzsek fúziójából életképes diploid termék származott, míg az azonos csoportból származó törzsekéből nem. A kapott diploidokból spóráztató táptalajon azigotikus aszkuszokat nyertünk, melyekkel októádanalízist végeztünk és megmértük a prototróf utódok arányát majd ebből az adatból rekombinációs gyakoriságokat számoltunk (lásd: anyagok és módszerek). Néhány esetben az így kapott Rf érték 0,5-nél (50%-nál) kisebbnek bizonyult (4. táblázat), ezen esetekben a vizsgált lokuszok között kapcsoltságot találtunk, tehát a két gén a kromoszómán helyileg egymáshoz közel található. Minél kisebb az Rf érték két lokusz között, a genetikai térképezés szerint annál közelebb vannak a gének egymáshoz a kromoszómán. Az így kapott értékekből kalkulálva két nagyobb kapcsoltsági csoportot tudtunk összeállítani, egyikben a gének valószínűsíthető sorrendjére is következtettünk. Az egyik csoport az *ura4* - *arg1* - *arg2* - *arg4*, melynek tagjai a kromoszómán is ebben a sorrendben követik egymást, a másik pedig a *lys1* - *lys2* - *lys6* - *lys5* .

Auxotróf lókuszok	Rekombinációs gyakoriság
<i>arg1 – arg4</i>	0,19
<i>arg2 – arg4</i>	0,19
<i>arg1 – arg2</i>	0,1
<i>arg1 – ura4</i>	0,083
<i>lys1 – lys5</i>	0,25
<i>lys2 – lys1</i>	15 oktádban nem volt prototróf
<i>lys1 – lys6</i>	20 oktádban nem volt prototróf
<i>lys5 – lys6</i>	22 oktádban nem volt prototróf

4. táblázat

Kapcsoltságok az egyes auxotróf lókuszok között

4.1.8. Az egyes auxotróf csoportok beazonosítása

Kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon az egyes auxotróf csoportok a bioszintetikus útvonal mely lépésében sérültek, azaz szerettük volna kideríteni, mely, már ismert bioszintetikus génnel mutatnak funkcionális homológiát. Mivel ezek az anabolikus útvonalak meglehetősen konzervatívak az egyes fajokban, a *Schizosaccharomyces pombe* már jól ismert bioszintetikus útvonalait vettük alapul. Az egyes útvonalak köztitermékeit alkalmaztuk és figyeltük az auxotróf mutánsok növekedését az intermedier termékkel kiegészített SMA táptalajon (lásd: anyagok és módszerek) (5. táblázat). Sajnos sok köztiterméket nem tudtunk beszerezni, másokról pedig bebizonyosodott, hogy a sejt nem képes azt felvenni, így a néhány, tesztelésre alkalmas anyagcsere-intermedier alapján csak az egyes csoportok hozzávetőleges helyét tudtuk meghatározni (6. táblázat).

A csoportok identifikálásában további segítséget jelentett, hogy egyes csoportok jellegzetes tulajdonságokat mutattak, másokról pedig korábbi kísérleteink alapján már egyéb információk is álltak rendelkezésünkre. Az adeninmutánsok 3-as és 4-es csoportjának tagjai például jellegzetes piros pigmentet termeltek, melyet a *S. pombe* egyes adeninmutánsaiból már jól ismerünk.

A 5'-FOA segítségével izolált ura^{-} auxotróf mutánsok pedig mind egy csoportba, (ura^{+}) voltak besorolhatók.

Auxotrófia	Csoportok	Anyagcsere-köztitermék	
		Van növekedés	Nincs növekedés
ADENIN⁻	<i>ade1</i> <i>ade2</i> <i>ade3</i> (piros) <i>ade4</i> (piros)	IMP IMP IMP	AICAR, IMP, SAMP AICAR, SAMP AICAR, SAMP AICAR, SAMP
ARGININ⁻	<i>arg1</i> <i>arg2</i> <i>arg3</i> <i>arg4</i> <i>arg5</i> <i>arg6</i> <i>arg7</i>	GM, GA, OR, NAGA	CI GM, GA, OR, NAGA, CI GM, GA, OR, NAGA, CI GM, GA, OR, NAGA, CI GM, GA, OR, NAGA, CI GM, GA, OR, NAGA, CI GM, GA, OR, NAGA, CI
LIZIN⁻	<i>lys1</i> <i>lys2</i> <i>lys3</i> <i>lys4</i> <i>lys5</i> <i>lys6</i> <i>lys7</i>	AAAA HCA, AKAA, AAAA AAAA	HCA, AKAA, AAAA HCA, AKAA, AAAA HCA, AKAA, AAAA HCA, AKAA, HCA, AKAA, HCA, AKAA, AAAA
URACIL⁻	<i>ura1</i> <i>ura2</i> <i>ura3</i> <i>ura4</i>	OA, UMP OA, UMP UMP UMP	USA, DHO USA, DHO USA, DHO, OA USA, DHO, OA

5. táblázat

Az egyes auxotróf csoportok növekedése a megfelelő bioszintetikus köztitermékeken.

Jelölések: IMP: inozitol 5'-monofoszfát; AICAR: 5-aminoimidazol karboxamid ribonukleotid;

SAMP: adenzin monofoszfát szukcinát; GM: glutamin; GA: glutamát; OR: ornitin;

NAGA: N-acetilglutaminsav; CI: citrullin; HCA: homocitromsav; AKAA: alfa-ketoadipinsav;

AAAA: alfa-aminoadipinsav; USA: ureidoszukcinát; DHO: dihidroorotát; OA: orotát

UMP: uridin 5'-monofoszfát

Auxotrófia	Komplementációs csoportok	Helyük a szintézisútban
URACIL⁻	1-es és 2-es csoport	Orotát előtt
	3-as és 4-es csoport	Orotát után, UDP előtt
ADENIN⁻	1-es csoport	IMP után
	2-4 csoportok	IMP előtt
ARGININ⁻	7-es csoport	glutamin előtt
	többi csoport	citrullin után

6. táblázat

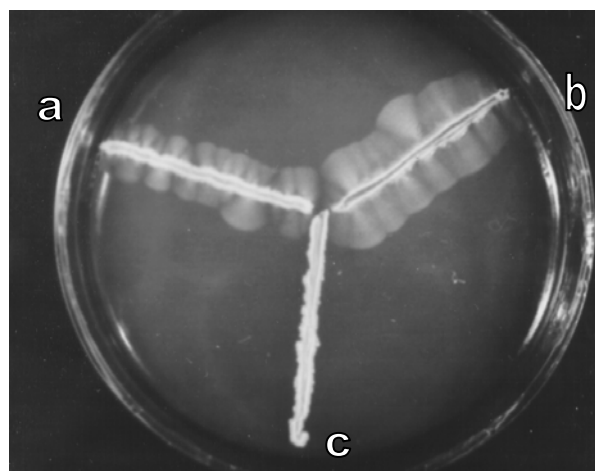
Az egyes auxotróf komplementációs csoportok hozzávetőleges helye a bioszintetikus útvonalakban

4.1.9. *myc* mutánsok izolálása és csoportosítása

A már meglévő auxotróf mutánsaink között olyanokat kerestünk, melyek a vad törzssel megegyező hifaképzési sajátságokat mutattak és ezek további UV mutagenézisnek vetettük alá.

Az így kapott mutánsok között olyanokra szelektáltunk, melyek auxotrófiájukat megtartották ám hifaképzési sajátságai a vad típusétól eltérők voltak. Az azonos idő alatt képzett hifák mennyiségét alapul véve találtunk hiperaktív hifaképzőket (*myc⁺⁺*); a vadhoz képest gyengébben hifázókat (*myc⁻*) sőt olyan mutánsokat is, melyek egyáltalán nem képeztek hifákat, teljesen képtelenek a metamorfózisra (*myc^{- -}*) (16. kép).

A *myc⁺⁺* mutánsok korábban kezdenek hifaképzésbe ezért nagyobb micéliumtömeget képeznek azonos idő alatt, mint a vadak. Némelyik *myc⁺⁺* mutáns olyan gyorsan fejleszt hifákat, hogy élesztőfázisuk szinte hiányzik. Ugyanakkor a legtöbb *myc⁺⁺* mutáns fenotípusa meglehetősen környezetfüggőnek bizonyult, némely esetben a vad fenotípustól alig lehetett elkülöníteni (túl öreg, száraz vagy nem elegendő tápanyagot tartalmazó táptalajon) sőt egyes törzseknél bizonyos számú generáció után eltűnt.



16. ábra

myc = mycelial mutant

a/ vad b/ *myc⁺⁺* c/ *myc^{- -}*

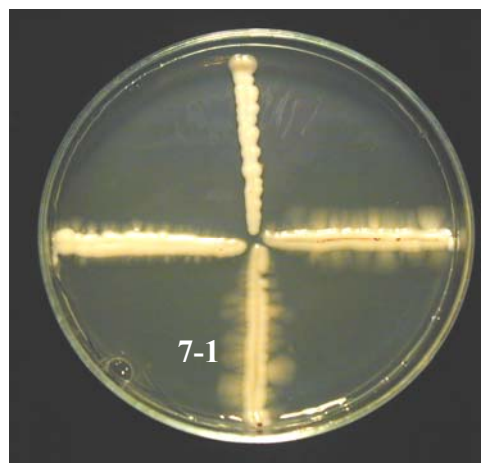
Ezért figyelmünk először a myc^- és myc^{--} mutánsok felé fordult. Mindenekelőtt minden egyes mutáns esetében bebizonyítottuk, hogy a fenotípust egyetlen gén hibája okozza-e. Ehhez vad típusú törzssel kereszteztük vissza őket és figyeltük, a myc morfológia a mendeli 4 : 4 szegregációs arányt mutatja-e. Valamennyi vizsgált myc mutáns esetében azt kaptuk, hogy a fenotípusért egyetlen gén hibája felelős, azaz mindegyik esetben 4 : 4 szegregációs arányt kaptunk a mutáns fenotípus megjelenésére. Azonkívül a myc morfológia a mutáns törzsekben jelenlevő auxotrófiáktól függetlenül rekombinálódott, tehát egyetlen esetben sem volt kapcsolat az auxotróf jelleg és a myc fenotípus között.

A továbbiakban kereszteztük egymással mutánsainkat (protoplaszt fúziók alkalmazásával), minden törzset mindegyikkel párosítva keresztezési mátrixot hajtottunk végre. A kapott diploidokból spóráztató táptalajon azigotikus aszkuszokat nyertünk, a bennük ülő 8 spórát kimanipuláltuk és mindegyik spórából származó telep auxotrófiáját illetve hifaképzési készségét (vad típus, mint kontroll mellett) meghatároztuk (17. ábra).

A kapott eredményekből a myc morfológiára nézve csoportokat tudtunk felállítani, ahol a csoportok valószínűsíthetően géneknek felelnek meg. Amennyiben a rekombináns spórák között nagy százalékban (25 %) kaptunk vad fenotípust mutató hifási sajátságú utódot, arra következtethettünk, hogy a szülői törzsek különböző lókuszbán sérültek voltak, azaz hibás micéliumképzési sajátságaik különböző gének hibájához voltak köthetők, így intergénés rekombináció révén e morfológiát tekintve létrejöhetett egészséges fenotípusú utódok. Ezeket a törzseket külön csoportokba soroltuk. Ha azonban nagyszámú rekombináns utód között sem találtunk a vadhoz hasonló hifázási tulajdonságút, a szülői törzseket azonos csoportba soroltuk, azaz feltételeztük, hogy azonos génhiba okozta myc morfológiájukat.

Meglepetésünkre azt kaptuk, hogy az összes vizsgált myc^- mutánsban különböző gén hibája okoz gyenge hifanövekedést, továbbá a gének között nem találtunk kapcsoltságot. (7. táblázat).

A különböző myc^- mutáns törzsekkel végzett keresztezések során kaptunk olyan rekombináns utódokat, amelyek mindkét myc^- mutációt együtt tartalmazták. Ezek fenotípusa gyakran még inkább csökkent (mindkét szülői myc^- fenotípushoz képest gyengébb) micéliáris növekedést mutatott, tehát a myc^- mutációk hatása összeadódott. Ez némely esetben akár a myc^{--} fenotípushoz is vezethetett.



17. ábra
 myc^- mutánsok keresztezéséből
származó utódok tesztelése hifa-
növesztésre vad 7-1 mellett

	7-50 <i>myc-1</i>	7-52 <i>myc-2</i>	7-78 <i>myc-3</i>	7-99 <i>myc-5</i>	7-100 <i>myc-6</i>	7-101 <i>myc-7</i>	7-102 <i>myc-8</i>	7-95 <i>myc-9</i>
7-50 <i>myc-1</i>	ϕ	+	+	+	+	+	+	+
7-52 <i>myc-2</i>	+	ϕ	+	+	+		+	+
7-78 <i>myc-3</i>	+	+	ϕ		+	+	+	+
7-99 <i>myc-5</i>	+	+		ϕ	+			
7-100 <i>myc-6</i>	+	+	+	+	ϕ	+		+
7-101 <i>myc-7</i>	+		+		+	ϕ		
7-101 <i>myc-8</i>	+	+	+				ϕ	
7-95 <i>myc-9</i>	+	+	+		+			ϕ

7. táblázat

A myc^{-} mutánsok keresztezési mátrixa.

+ jelzés mutatja, hogy a *myc* morfológiát tekintve nagyszámú, vad típusú utódot kaptunk, azaz az adott két törzs különböző csoportba sorolható. ϕ jel mutatja, hogy egy törzs önmagával való keresztezése értelmetlen, ezért ezen párosításokat nem végeztük el. Az üresen hagyott helyeken nincs még adat.

A $myc^{- -}$ mutánsokat vizsgálva azonban kaptunk azonos génben sérült mutánsokat, a meglévő négy $myc^{- -}$ törzsből három azonosnak, egy tőlük különbözőnek bizonyult (8. táblázat).

	7-63 <i>myc-4</i>	7-96 <i>myc-10</i>	7-147 <i>myc-30</i>	7-148 <i>myc-31</i>
7-63 <i>myc-4</i>	ϕ	----	+	----
7-96 <i>myc-10</i>	----	ϕ	+	----
7-147 <i>myc-30</i>	+	+	ϕ	+
7-148 <i>myc-31</i>	----	----	+	ϕ

8. táblázat

A $myc^{- -}$ mutánsok keresztezési mátrixa.

+ jelzés mutatja, hogy a *myc* morfológiát tekintve nagyszámú, vad típusú utódot kaptunk, azaz az adott két törzs különböző csoportba sorolható. --- jelzés mutatja, hogy nagyszámú rekombináns utód között sem találtunk a *myc* morfológiát tekintve vad fenotípusút, így a törzsek azonos csoportba tartoznak.

Mindazonáltal a myc^{++} mutánsokat is vizsgáltuk. Az általunk tanulmányozott négy myc^{++} törzs mindegyikénél egy gén hibájára volt visszavezethető a fenotípus: mindegyik esetben mendeli 4 : 4 megoszlást kaptunk a mutáns fenotípus megjelenésére az utódokban vad törzzsel való keresztezéskor. A négy myc^{++} törzset egymás ellen is teszteltük és az így kapott eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált törzsek mindegyike különböző génben sérült (9. táblázat).

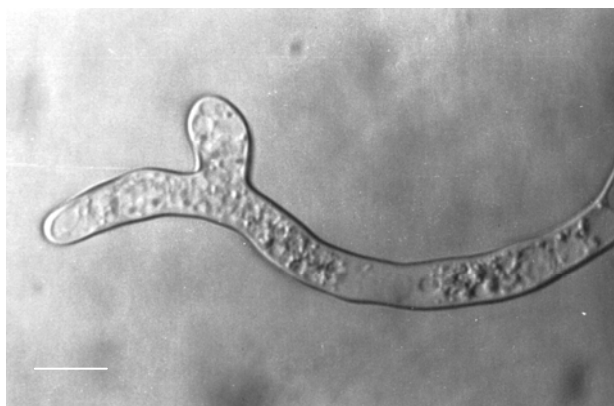
	7-10 <i>myc-15</i>	7-86 <i>myc-18</i>	7-88 <i>myc-20</i>	7-92 <i>myc-14</i>
7-10 <i>myc-15</i>	ϕ	+	+	+
7-86 <i>myc-18</i>	+	ϕ	+	+
7-88 <i>myc-20</i>	+	+	ϕ	+
7-92 <i>myc-24</i>	+	+	+	ϕ

9. táblázat

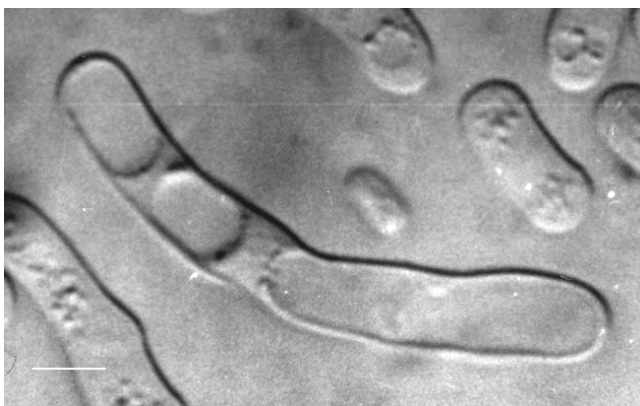
A myc^{++} mutánsok komplementációs mátrixa

4.1.10. Diploid sejtek hifaképzése

A protoplaszt fúzióval képzett diploidok is képesek voltak bizonyos idő után diploid hifák fejlesztésére. Minimál táptalajon 30 °C-on megfelelő ideig (1-1,5 hét) tenyésztve a diploid sejtek dimorf átalakuláson mentek keresztül és hifafonalakat fejlesztettek. Ezen hifákat mikroszkóp alatt megvizsgálva szabályos, intakt szeptumokkal határolt, elágazó fonalakat láttunk. Jól vastagabbak, nagyobb méretűek voltak a haploid hifákhoz képest – hiszen maguk a diploid sejtek is 2x-3x nagyobbak mint a haploidok – ám celluláris szerveződésük teljesen hasonló azokéhoz (18. ábra).



Haploid hifa



Diploid hifa

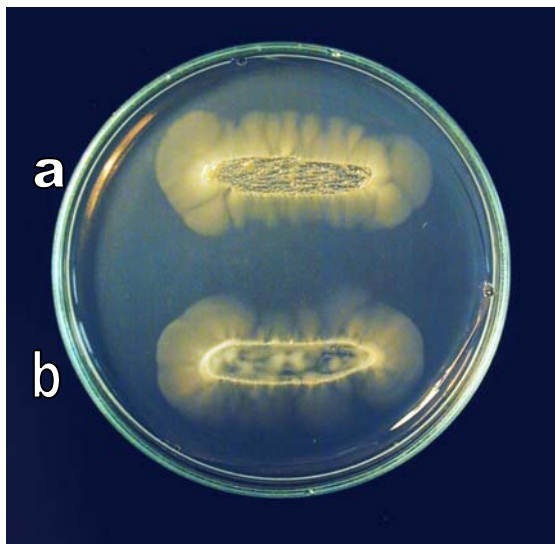
18. ábra

Haploid és diploid hifák Nomarski objektívvel fényképezve. Méretvonal: 10 μ m

A diploid hifák növekedési üteme pedig a haploid hifák növekedési ütemével megegyező volt, vagy egészen enyhén lassabb, mely a nagyobb sejtméret arányosan nagyobb citoplazmaképzési igényével magyarázható.

4.1.11. Klasszikus komplementáció a *myc* mutánsok diploidjainál

Különböző génben sérült *myc*⁻ mutánsokból (7-63 és 7-147) protoplaszt fúzióval diploid törzset hoztunk létre és EMMA + tiamin minimál táptalajra csíkoztuk vad 7-1-es törzs mellett vizsgálva. Azt találtuk, hogy a diploid képes volt a vad törzsszel megegyező mértékű micéliumképzésre, azaz megvalósult benne a valódi komplementáció jelensége: a diploidban mindkét hibás gén mellett megtalálható volt azok hibátlan allélja is és ezek megléte egyetlen példányban is biztosította a zavartalan hifaképződést (19. ábra A).



A.

a/ 7-1 (vad)
b/ 7-63 (*myc*⁻) / 7-147 (*myc*⁻)



B.

a/ 7-1 (vad)
b/ 7-16 (*myc*⁺) / 7-63 (*myc*⁻)

19. ábra

Valódi komplementáció jelensége EMMA + tiamin táptalajon 30 °C-on 12 nap után

Annak bizonyítására, hogy a diploid törzs körül látható micéliumtömeg valóban **diploid** hifákból áll spatulával óvatosan kiemeltünk belőle egy agarkockát és friss minimál táptalajra (SMA) helyeztük. Néhány nap múlva a friss táptalajon kinövekedtek belőle az élesztősejtek, melyeket mikroszkóp alatt megvizsgálva diploid morfológiát mutattak. Ezeket a sejteket EMMA-N spóráztató táptalajra téve azigotikus aszkuszkokat kaptunk, melyekből kimanipulálva a spórákat és meghatározva az

azokból felnövekvő telepek auxotrófiáját visszakaptuk a szülői auxotróf alléleket mendeli arányban. Mindez azt bizonyítja, hogy a diploid csík körül kinövekedett hifák valóban diploidok voltak, tehát klasszikus komplementáció történt.

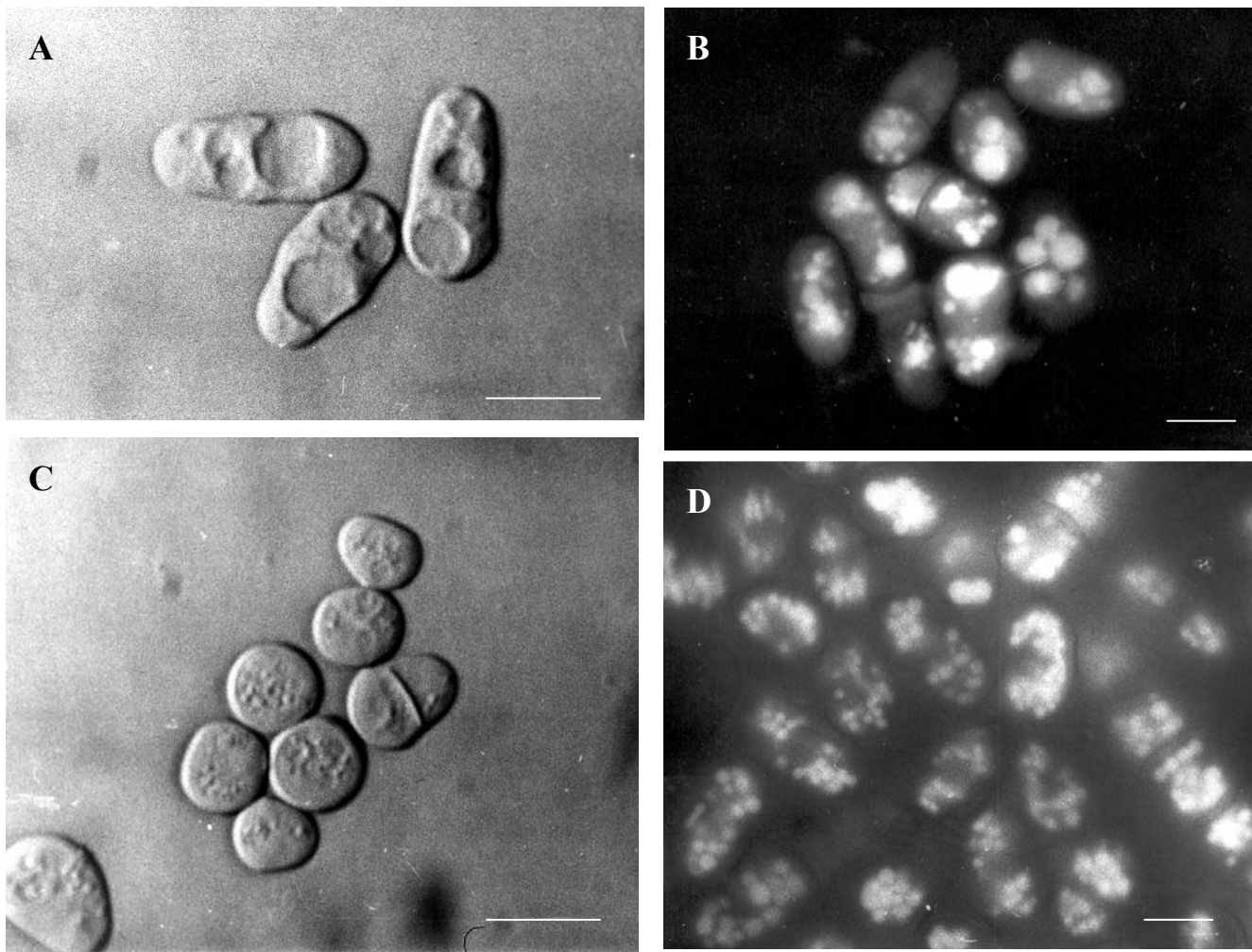
Kíváncsiak voltunk, vajon $myc^{-/-}$ és $myc^{+/+}$ mutánsok fúziójából származó diploidok is mutatják-e a teljes komplementáció jelenségét. Létrehoztuk a diploidot a 7-16 ($myc^{+/+}$) és 7-63 ($myc^{-/-}$) törzsekől, majd micéliumképzési aktivitásukat néztük vad haploid 7-1 törzs mellett. Várakozásunknak megfelelően itt is ezt az eredményt kaptuk: a diploidok által képzett hifák mennyisége, növekedésük üteme a vad típussal megegyező volt (19. ábra B). Mindemellett ezen diploidokból meiózist követően kapott rekombináns haploid utódok közül a kettős mutánsok (melyek együtt tartalmazzák a $myc^{-/-}$ és $myc^{+/+}$ géneket) fenotípusa $myc^{-/-}$ -nek bizonyult.

4.1.12. A *myc* mutánsok vakuoláris mintázata

Fluoreszcens vakuólumfestéssel láthatóvá tettük a 7-1 vad típusú törzs és a különböző myc^{-} és $myc^{-/-}$ mutánsok ($myc^{-/-}$) vakuólumait (lásd: anyagok és módszerek). UV mikroszkóp alatt vizsgálva a sejteket eltérésre lettünk figyelmesek a vad 7.1 és a $myc^{-/-}$ mutánsok vakuoláris mintázatát illetően (20. ábra).

Míg a vad típusú sejtben apróbb és nagyobb vakuólum egyaránt előfordult, szilárd táptalajon tenyésztett 4-5 napos sejteknél pedig néhány feltűnően nagy vakuólum is volt, addig a $myc^{-/-}$ törzsek sejteinek többségére a sok apró vakuólum volt jellemző, néhány nagyobb, fuzionált vakuólum csak elvétve fordult elő.

Bár voltak olyan myc^{-} mutáns törzsek, melyeknél ez a jelenség nem volt megfigyelhető, a legtöbb myc^{-} törzsnél azonban egyértelműen észleltük, a $myc^{-/-}$ törzsek pedig kivétel nélkül, egyöntetűen mutatták. Az azonos génben sérült három $myc^{-/-}$ mutáns (7-63, 7-96 és 7-148) pedig teljesen azonos vakuoláris mintázatot mutatott: citoplazmájukban sok apró, egyenlő méretű vakuólum volt, egyetlen nagyobb, fuzionált vakuólumot sem észleltünk. Tehát a jellegzetes vakuólum-mintázat korrelációt mutatott a micéliáris mutációval. Azonkívül számos esetben a $myc^{-/-}$ törzsek feltűnően lekerekedettek is voltak (20. ábra C).



Nomarski objektívvel készített felvétel

Vakuolumfestés fluoreszcens festékkel

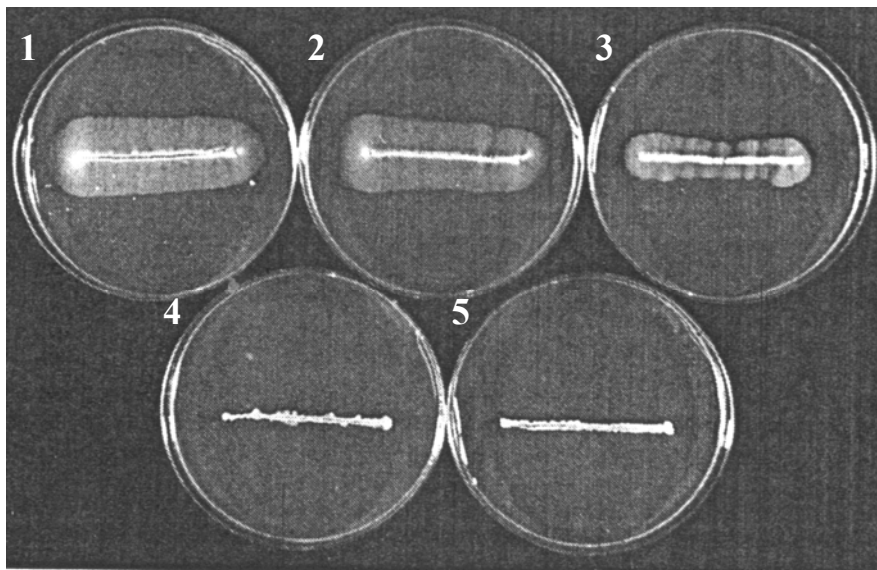
20. ábra

A $myc^{-/-}$ mutánsok vakuoláris mintázata a vad típusétól eltérő. Méretvonalak: 10 μm

A felső sorokban (A, B) a 7-1 vad típusú sejt, az alsó sorokban (C, D) a myc^{-} mutánsok egyik jellemző törzse látható.

4.1.13. A *myc* törzsek koffeinerzékenység-vizsgálata

A *S. japonicus* hifanövekedése érzékeny koffeinre. A dimorf átalakuláshoz az intracelluláris cAMP erőteljes lecsökkenésére van szükség; a koffein gátolja a cAMP-foszfodiészterázt (Beach és tsi., 1985), ezáltal magas szinten tartja a cAMP-t, mellyel meggátolja a hifanövekedés beindítását (lásd: irodalmi áttekintés). 0 mM-tól 5 mM-ig növelve a táptalaj koffeinkoncentrációját fokozatosan gyengülő hifanövekedést észlelünk. 5 mM koncentrációjú koffein pedig tökéletesen meggátolja a hifaképződést (Sipiczki és tsi., 1998 b) (21. ábra).



21. ábra

Koffein gátló hatása a *S. japonicus* micéliumnövesztésére (Sipiczki és tsi., 1998 b).

Koffeinkoncentráció az első csészétől növekvő sorrendben: 0mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,5mM, 5 mM.

(A kép a cikkből származik, a szerző engedélyével közölve).

Tovább növelve a koffeinkoncentrációt a táptalajban az élesztősejt-növekedés is egyre gyengülő tendenciát mutatott, majd 10 mM-os koffeinkoncentrációnál már nem észleltünk sejtnövekedést. Hasonló eredményeket adtak a *myc* mutánsokkal végzett kísérletek is. Függetlenül a *myc* mutáció jellegétől ezen értékek köré csoportosultak az eredmények, szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk (10.-11. táblázat). A *myc*⁺⁺ hifanövekedése is gátlódott 5 mM-nál, az érték nem tolódott ki magasabb koncentrációk felé; a *myc*⁻ mutánsoknál pedig az eleve meglévő, gyenge hifaképzéssel arányosan egyre rövidebb micéliumokat kaptunk a koffeinkoncentráció emelésével, azonban a hifanövekedés abszolút mértékben itt is csak 5 mM-os értéknél gátlódott.

A vad 7.1-es törzs UV mutagenézisét követően izoláltunk olyan koffeinrezisztens mutánsokat is, melyek képesek voltak még 10 mM-os értéknél élesztősejtet növeszteni illetve olyanokat, melyek 5 mM-os értéknél még képeznek hifát (lásd: anyagok és módszerek). A két tulajdonságot együtt tartalmazó mutánst nem találtunk. Ezen mutánsok hifaképzési sajátosságait vizsgálva azt kaptuk, hogy sem az 5 mM-nál még enyhe hifaképzést mutató, sem a 10 mM-nál élesztősejt-növekedésre képes mutánsok hifaképzési mértéke nem tért el a vad típusétól normál körülmények között.

Törzsek	Micéliumnövekedés (mm) a megadott koffeinkoncentrációknál 12 nap után							
	0 mM	0,2 mM	0,6 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM
7-50 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura2-6 myc-1</i>	1,5	1	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	---
7-52 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura1,3-8 myc-2</i>	5	5	4	2,5	1	0,5	0,1	---
7-78 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura2-21 myc-3</i>	2,5	2	1	0,5	0,2	0,1	---	---
7-63 (<i>myc</i> ^{- -}) <i>leu3-10 myc-4</i>	---	---	---	---	---	---	---	---
7-16 (<i>myc</i> ⁺⁺) <i>ura2-16 myc-15</i>	12	7	5	4	3	0,5	0,1	---
7.1 (vad)	7	7	6	5	3	0,5	0,1	---

10. táblázat

A *myc* mutánsok micéliáris fázisának koffeinerzékenysége (néhány, a csoportra legjellemzőbb törzs adatait kiemelve).

Törzsek	Élesztősejt-növekedés az egyes koncentrációértékeknél				
	6 mM	7 mM	8 mM	9 mM	10 mM
7-50 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura2-6 myc-1</i>	nő	nő	nő	nehezen nő	nem nő
7-52 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura1,3-8 myc-2</i>	nő	nő	kevés telep	6-7 telep	nem nő
7-78 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura2-21 myc-3</i>	nő	nő	nő	nehezen nő	nem nő
7-63 (<i>myc</i> ^{- -}) <i>leu3-10 myc-4</i>	nő	nő	nő	nő	nem nő
7-16 (<i>myc</i> ⁺⁺) <i>ura2-16 myc-15</i>	nő	nő	nő	nő	nem nő
7.1 (vad)	nő	nő	nő	nő	nem nő

11. táblázat

A *myc* mutánsok élesztőfázisának koffeinerzékenysége (néhány, a csoportra legjellemzőbb törzs adatait kiemelve).

4.1.14. A *myc* mutánsok tesztelése benomylal szembeni rezisztenciára

A benomyl egy közismert gyomirtószer. A sejt citoszkeletáris rendszerén keresztül fejti ki toxikus hatását (mikrotubulusok szerveződését gátolja) (That és tsi., 1985). *S. pombe* egyes pszeudomicéliumot képző szeptációs mutánsainál például a citoszkeleton módosult, ezáltal a sejtek enyhén rezisztensebbek a benomylra (Sipiczki és tsi., 1993).

Megvizsgáltuk a *myc* mutáns törzsek benomylérzékenységét, és azt tapasztaltuk, hogy nem tért el szignifikánsan a 7-1 vad típusétól. A *S. japonicus* 7-1-es vad típusú törzs érzékenysége azonos volt a *S. pombe* 0-1 L-972-es vad típusú törzsének érzékenységével, azaz mindkét fajnál 8 µg/ml benomilkoncentráció volt az a határérték, melynél sejtnövekedés már nem tapasztalható. A *myc* mutánsok is ezt az érzékenységet mutatták (12. táblázat).

Törzsek	Élesztősejt-növekedés az egyes koncentrációértékeknél				
	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	12 µg/ml	16 µg/ml
7-50 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura2-6 myc-1</i>	nő	nő	---	---	---
7-52 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura1,3-8 myc-2</i>	nő	nő	2 telep	---	---
7-78 (<i>myc</i> ⁻) <i>ura2-21 myc-3</i>	nő	nő	4 telep	6 telep	---
7-63 (<i>myc</i> ⁻) <i>leu3-10 myc-4</i>	nő	nehezen nő	---	---	---
7-16 (<i>myc</i> ⁺⁺) <i>ura2-16 myc-15</i>	nő	nő	---	---	---
7.1 (vad)	nincs adat		1 telep	---	---

12. táblázat

A *myc* mutánsok benomylérzékenysége
(néhány, a csoportra legjellemzőbb törzs adatait kiemelve).

4.1.15. Transzformációs kísérletek

Az izolált mutánsainkat megpróbáltuk transzformálni a rendelkezésünkre álló leggyakrabban használt *S. pombe* és *S. cerevisiae* vektorokkal, az élesztőknél rutinszerűen alkalmazott bevált transzformációs módszerekkel.

4.1.15.1. Auxotróf fenotípus transzformálása prototróffá

Legelőször az izolált uracil és leucin auxotróf mutánsainkat próbáltuk meg transzformálni *S. pombe* és *S. cerevisiae* auxotrófiákat komplementáló géneket tartalmazó plazmidokkal.

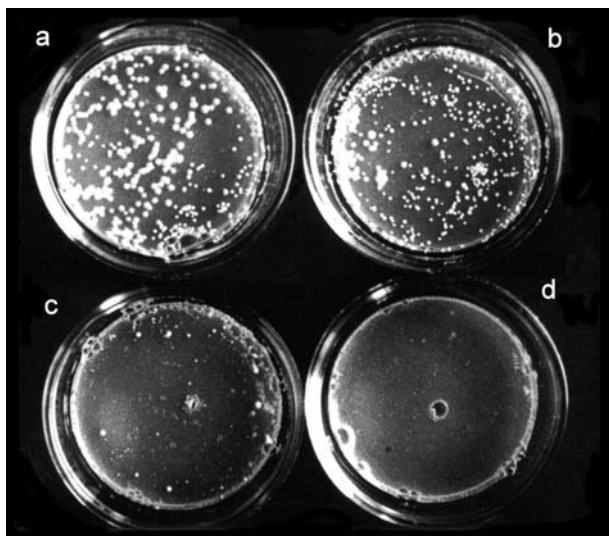
A leucin mutánsokat a *S. cerevisiae* *LEU2* (*pombe leu1* homológ) gént tartalmazó plazmidokkal (pJDB 207; pEVP11; pBEJ16), az uracil mutánsokat *S. pombe ura4* gént tartalmazó plazmiddal (pURN18) transzformáltuk; az elsőként említett három plazmid a *S. cerevisiae* 2 μ -os plazmidjának replikációs origóját (autonóm replikációs szekvencia, ARS), a pURN18 plazmid pedig a *S. pombe* ARS-ét tartalmazta.

A transzformálások eredménytelenek voltak annak ellenére, hogy mindhárom, az élesztőknél bevált transzformációs módszert alkalmaztuk (litium-acetátos módszer, protoplasztos transzformálás, elektroporézis). Nagy ritkán kaptunk egy-egy telepet, melyek sohasem mutattak plazmidvesztést; ezek valószínűleg integratívok vagy ritkán előforduló backmutánsok voltak. A kontrollként használt *S. pombe* mutánsok (0-38 *leu1-32*, 0-92 *ura4-D18*) mindig kitűnően transzformálhatók voltak. A kudarc oka lehet, hogy nem az auxotróf törzsek hibás génjének megfelelő gént juttattuk be a törzsekbe - hiszen mind a leucin, mind az uracil bioszintézisében számos gén vesz részt - vagy ha az jutott be, nem komplementált, illetve ha enyhén tudta is a rokon fajból származó gén komplementálni az auxotrófiát, az idegen ARS nem működött a *S. japonicus*-ban, így csak néhány integratívnak tűnő transzformánst kaptunk.

4.1.15.2. Transzformálás rezisztenciagénekkel

A transzformálás kudarcának számos bizonytalansági tényezője közül az egyiket - miszerint nem tudjuk, hogy a megfelelő gén jut-e be a törzsbe - kiküszöböltük úgy, hogy a vektorral olyan markert vittünk be, mely ha bejut a sejtbe, az általa kódolt fenotípus mindenképpen, a transzformált törzs genetikai hátterétől függetlenül is megnyilvánul. Ilyen domináns markerek az antifungális szerek: geneticin (neomycin) illetve hygromycin elleni rezisztenciát hordozó gének.

Mindenekelőtt megnéztük a *S. japonicus* érzékenységét az adott szerekkel szemben. Érdekes módon a *S. japonicus* 7-1 vad törzs tűréshatár-értékei mindkét szerrel szemben sokkal magasabbak voltak mint a *S. pombe* 0-1 L 972 vad típusú törzsé (22. ábra, 13. táblázat)



22. ábra

A *S. japonicus* 7-1 antimikotikum-érzékenysége hygromycinre tesztelve a/ 70 µg/ml b/ 80 µg/ml c/ 90 µg/ml d/ 100 µg/ml

	Geneticin	Hygromycin
<i>S. pombe</i> 0-1 <i>L 972</i>	40 ug/ml	20-30 ug/ml
<i>S. japonicus</i> 7-1	90 ug/ml	100 ug/ml

13. táblázat

Tűrészatár-értékek hygromycin és geneticin vonatkozásában *S. pombe* 0-1 *L 972*-re és *S. japonicus* 7-1- re tesztelve

Transzformáltuk a *S. japonicus* vad 7-1 törzset geneticin rezisztenciát tartalmazó plazmiddokkal (pBEJ; pEVP11) illetve a hygromycin rezisztenciát tartalmazó plazmiddal (pBG1) és az egyes transzforánsokat a megfelelő antimikotikumot tartalmazó csészékre szélesztettük.

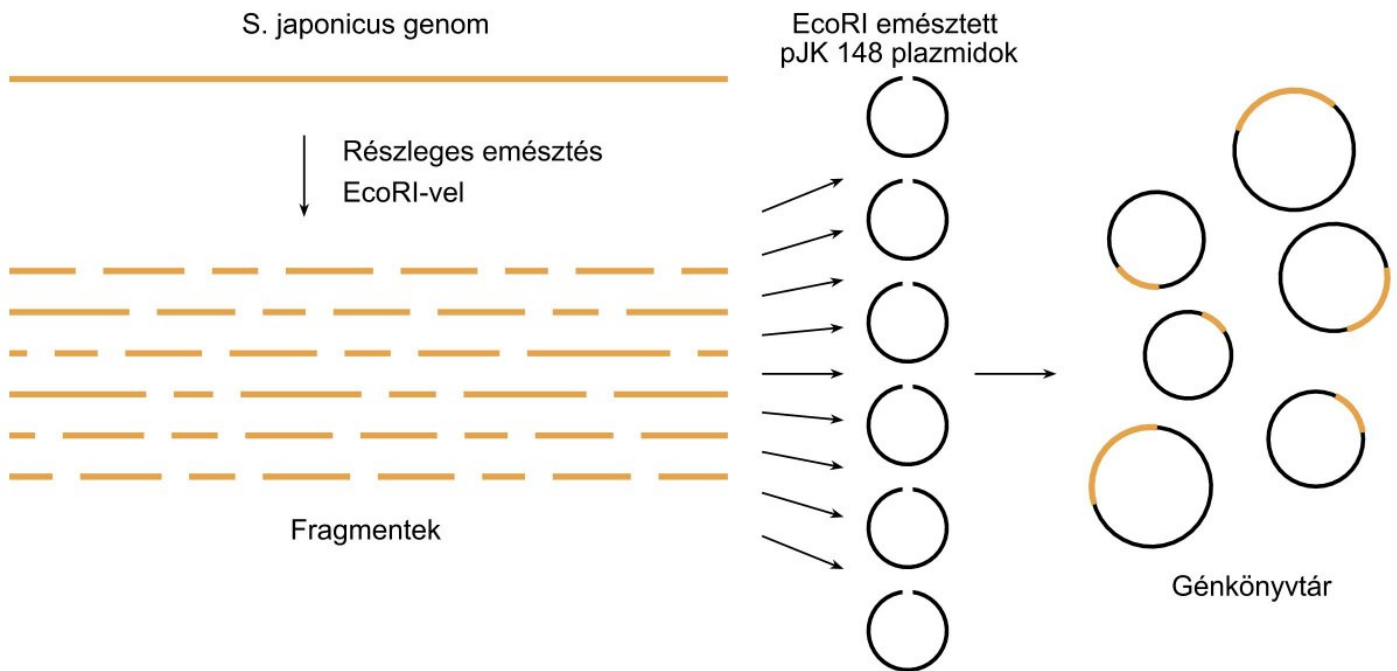
A *S. japonicus* 7-1 esetében soha nem kaptunk transzformánst, míg a kontrollként használt *S. pombe* *L 972* 0-1 mindig kitűnő eredményt adott; sok rezisztens teleppel. A jelenség oka lehet, hogy a két rezisztenciagén egyike sem működik a *S. japonicus*ban, mivel azonban ezek a rezisztenciák igen univerzálisak és a legkülönbözőbb fajokban alkalmazhatók, sokkal valószínűbb az, hogy a plazmidok által tartalmazott *S. pombe* ARS nem alkalmas a plazmidok fenntartására a transzformánsokban.

Hasonlóan negatív eredményt kaptunk a *S. cerevisiae*-ből származó 2µm-es plazmiddal történő transzformálások esetén is, azaz úgy tűnik, sem a *S. pombe*, sem a *S. cerevisiae* ARS-e sem megfelelő a *S. japonicus* számára.

4.1.16. Fajazonos ARS izolálása *S. japonicus*ból

Mindezen transzformációs sikertelenségek arra készítettek minket, hogy a *S. japonicus* genomjából saját ARS-t izoláljunk és ezt használjuk fel a transzformációs plazmidokban, ezáltal lehetővé téve a transzformáns sejtekbe bejutott plazmid replikálódását így fennmaradását.

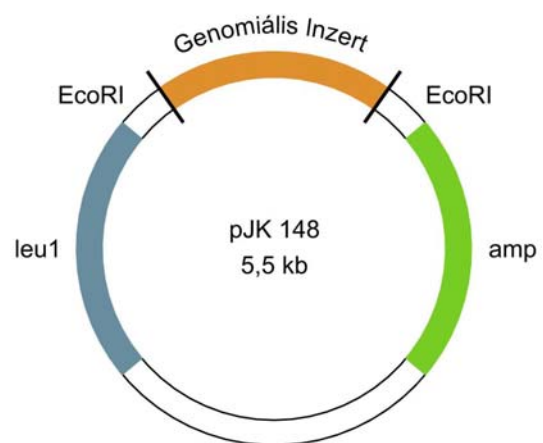
Mindehhez először génkönyvtárat készítettünk pJK148 *S. pombe leu1* markert tartalmazó integratív plazmidban (lásd: anyagok és módszerek) (23. ábra).



23. ábra
Genomiális génkönyvtárkészítés *S. japonicus* 7-1 -ből
pJK148 integratív plazmidba

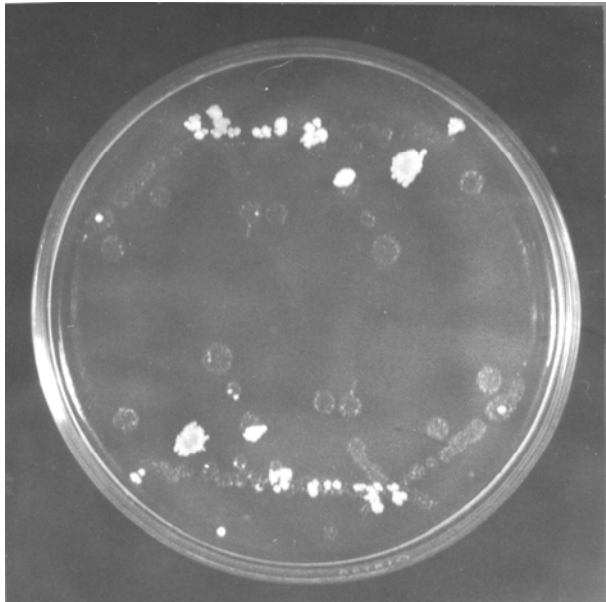
A génkönyvtárral transzformáltuk a *S. japonicus* leucin mutáns törzseit. Pozitív kontrollként a *S. pombe* 0-1 *leu1-32* mutánsát alkalmaztuk. A transzformálás az egyik leucin mutáns törzs (7-63 *leu3-10 myc-4*) esetében sikeres volt, azaz minden alkalommal kaptunk néhány telepet. Csészénként 3-4 telep növekedett ki, öt csészéről 16 db telepet izoláltunk. Ez a törzs tehát komplementálható volt a *S. pombe leu1* génjével, tehát hibás leucingénje egyértelmű homológja annak. A kapott transzformáns telepek mindegyikét leteszteltük plazmidvesztésre (lásd: anyagok és módszerek).

Számos olyan telepet találtunk (a 16 telepből 15-öt), mely igen erős plazmidvesztést mutatott (25. ábra), tehát feltételezhető volt, hogy a bekerült vektor extrakromoszómálisan szaporodhatott a genomiális inzerttel bekerült ARS funkciójú szekvenciárészlet miatt. Az így fennmaradni képes plazmidokat, melyek a sejt valamely mutáns fenotípusát komplementálni képesek, könnyen elveszti a sejt permisszív körülmények közé kerülve. Visszanyertük a plazmidot az egyik, plazmidvesztést mutató telepből (lásd: anyagok és módszerek). Az így kapott plazmidnak pJKA elnevezést adtunk (24. ábra).



24. ábra
pJKA (pJK148 plazmid az inzerttel)

EcoRI emésztéssel kivágtuk a genomiális inzertet a visszanyert pJKA plazmidból. Emésztés után megfuttattuk az így kapott DNS-t és azt láttuk, hogy az üres plazmid sávja mellett (5,5 kb) még két sávot kaptunk (1,5 kb és 2,5 kb), azaz az enzim egy helyen belevágott a genomiális inzertbe is (26. ábra).



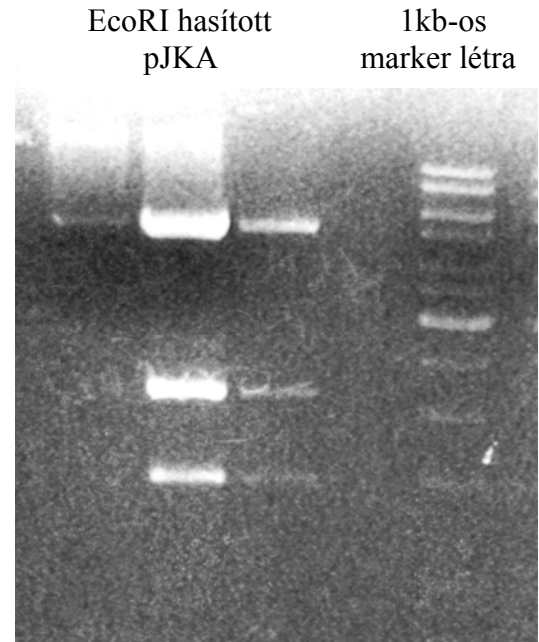
25 ábra

Plazmidvesztés kimutatása SMA táptalajon. A növekvő telepek megtartották plazmidjukat, míg a nem növekvők (többség) elvesztették azt.

5,5 kb

2,5 kb

1,5 kb



26. ábra

A plazmidvesztést mutató transzformánsból visszanyert plazmid emésztése EcoRI enzimmal. A pJK148 plazmid sávja (5,5 kb) mellett két inzertfragmentet kaptunk (1,5 kb és 2,5 kb).

Szubklónoztunk az 1,5 kb és 2,5 kb nagyságú genomiális fragmentekkel, azaz mindkettőt külön-külön beépítettük pJK148 integratív plazmidba és transzformáltuk velük a 7-63 *leu3-10 myc-4* törzset. Az 1,5 kb-os fragmentet tartalmazó plazmiddal történő transzformálások során mindig kaptunk transzformáns telepeket, melyek mindegyike mutatta a plazmidvesztést (14. táblázat), míg a 2,5 kb-os fragmentet tartalmazó plazmiddal történő transzformálások esetén sosem kaptunk telepeket. Midezen eredményekből arra következtettünk, hogy az ARS funkcióért az 1,5 kb-os fragmenten található szekvencia felelős.

Az így kapott, hipotetikus (feltételezett) ARS hatásfoka azonban meglehetősen alacsony. A plazmidvesztés már a minimál táptalajon megkezdődik, a plazmidvesztési teszt eredménye pedig 3%, ami jóval alatta marad a *S. pombe* replikatív plazmidjainál mért értékeknek (kb. 40%). Feltehető, hogy nem ARS-t, hanem ARS funkciót is némileg ellátni képes szekvenciát leltünk. A génkönyvtárral történő sorozatos transzformálások ellenére azonban sosem kaptunk olyan transzformáns telepet, melynek plazmidvesztési rátája ennél lényegesen jobb lett volna.

Transzformált törzs	Telepszám / csésze		
	pJKA	1,5 kb-os fragmentet tartalmazó pJK148	2,5 kb-os fragmentet tartalmazó pJK148
<i>S. japonicus</i> 7-63 <i>leu3-10 myc-4</i>	12-16	20	0
<i>S. pombe</i> 7-38 <i>leu1-32</i>	15-16	60-70	60-70

14. táblázat

A 7-63-as *S. japonicus* törzs különböző plazmidokkal való transzformálásakor kapott telepszámok.

4.1.17. Az 1,5 kb fragment szekvenciája

Beépítettük az 1,5 kb nagyságú genomiális fragmentet pURN18 plazmidba, és elküldtük szekvenálásra a Szegedi Biológiai Intézetbe (SZBK). A teljes szekvencia, melyben a nukleotidsorrendből (felső sor) kikalkulált aminosavsorrend (also sor) is látható:

```

cttccatcgacaggctcttggaaactgccaggaaaactggtattcaagttt
F H R Q A L G T A R K T G I Q V S
ctgctttacggagtaatctacctttatccctattactaacaanaagtga 100
A L R S N L P L S L L L T K S G
cggactgccgaaggcgaaaagttactggttgaatcagaagcattactaaa
R T A E G E K L L V E S E A L L K
actcaaccaaccctaccataagctactatggttacttacggccgcagaat 200
L N Q P Y H K L L W L L T A A E S
cacatgaagcgaacgggtgtattgacaaaactatggatacttatgccatg
H E A N G C I D K T M D T Y A M
tgttttagatctcatcaatactatggttgatagactgttccaaaatggc 300
C L D L I N T M L C I D C S K M A
acagctaccttcattgattgcggatttacattcgttatctctttcgcttg
Q L P S L I A D L H S L S L S L G
gatcttctgaaaatgacaataaaggtggtatgggaacagcagttcttaac 400
S S E N D N K G G M G T A V L N
gatttaaaagcaacaattacacggaacaatcactacatatggctagtca
D L K A T I T R K Q S L H M A S Q
gtattgcatagacgatgcaaaaaggttatttaaagactcacttcgtaaga 500
Y C I D D A K R L F K D S L R K N
acatttctcaacttctacaatacgggtgtcttccaaaattgctcgatcaaaa
I L N F Y N T V S S K I A R S K
attatgctatagcaaacagagtacacactgaagagtgatcctgttttacg 600
I M L Y E T E Y T L K S D P V L R
aaccttacgggattcagttatttctcttccaggagtaagcaaaaagc
T L R D S V I S L P G V S K Q K Q
aaaaacaaactaaggcatttattagttttagatagtcgaaggttgcgctca 700

```

```

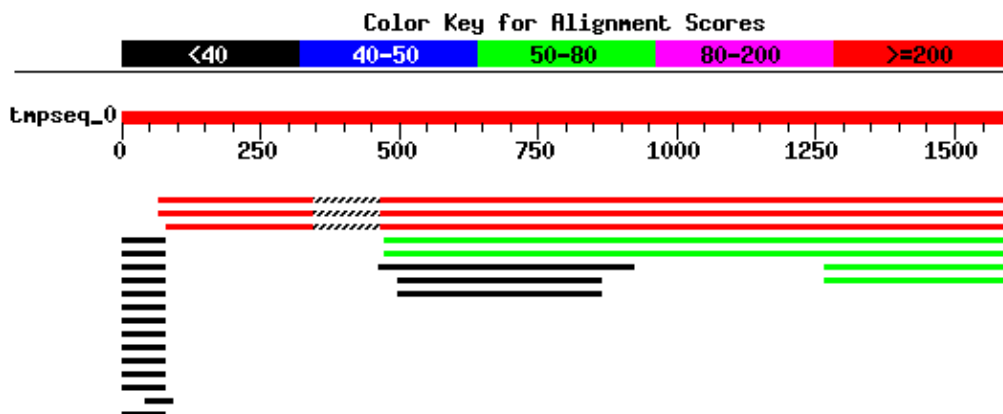
K Q T K A F I S L D S P R L R S
aatcttactcagaaagggcgaagcaaaatggacattcttcgtgatcgttt
N L T Q K G E S K M D I L R D R L
acgtgtgattcttgaatcagcaagccgaaactgtgaggaaatattccagg 800
R V I L E S A S R N C E E I F Q E
aggtttactcaaagggctcagtacagttatgtcgtaacacaaatgagttg
V Y S K G S V Q L C R N T N E L
cttttctacacgactattatgcaaaacgggctaattaacctcgatcctcc 900
L F Y T T I M Q N G L I N L D P P
gaaagaaccagacgctgttatagcttcttattttcttagaatcaagtaaag
K E P D A V I A S Y F L E S S K A
cattgggcatttctcaccgcattttctttcgcaatctgtcgcgcaaaatc 1000
L G I S H R I F F R N L S R K I
gatctgaagtccccaaattcaaatttgatgatgaaagtatcgtcatgcgg
D L K S P N S N L M M K V S S C G
cgaactcccgaaggaacaagactttaaatgcgatgttattgatacacttc 1100
E L P K E Q D F K C D V I D T L P
cactcaattggagtatcgtgaagcattgctatcagtgagtcaaaagaagac
L N W S I V S I A I S E S K E D
ttatttctttctaaagttcgaaaaaatcaaaatccccttgttgttcgcct 1200
L F L S K V R K N Q N P L V V R L
ccctcttcagcggcataattcacgagatgctgatgaggagatattcttgt
P L Q R H N S R D A D E E I F L F
ttcaatctgcctacgatgagcttcaatctatcattgatcggagtaatcaa 1300
Q S A Y D E L Q S I I D R S N Q
attactcgtgaaggaaaagactataaaacaagagaagaaaaagaaagatg
I T R E G K D Y K T R E E K E R W
gtggaaagaacgtcgggaattagactgtacgctagctgcactcttaaaca 1400
W K E R R E L D C T L A A L L N N
atatagaatcctgctggccttggcggattcaagggatattttcatccaaa
I E S C W L G G F K G I F S S K
aggcctcacaagaaagccttcatgcggttttcctatcaatttaagagagt 1500
R P H K E S F M R F S Y Q F K R V
tcttggtaaaaatcttacatttcttactaa
L G K N L T F L T 1531

```

A szekvenciát megvizsgálva találtunk rajta néhány oligonukleotid-részletet (a szekvenciában pirossal jelölve), melyek a *S. pombe* egyik típusú ARS-ének konszenzus szekvenciájához (PACS) volt hasonló: PACS: (A/T)PuTT-TATTTA(A/T).

4.1.18. Homológia keresése

Az NCBI adatbázis BLAST-szolgáltatásának felhasználásával homológiákat kerestünk a megszekvenáltatott *S. japonicus*-szekvenciára más fajokból származó génekkel. Jelentős homológiát nukleinsav-sorrend szintjén nem találtunk, a belőle származtatott aminosav-sorrend szintjén azonban számos homológiára leltünk (27. ábra)



27. ábra

Homológiák fehérjeszinten a *S. japonicus* 1,5 kb-os szekvenciájával.

A homológ fehérjék szerepe az adott fajnál zárójelben feltüntetve

cut1 protein (*S.pombe*; anafázisba való belépés, testvérkromatidák szétválása)

Bimb1 protein (*Aspergillus nidulans* SPB reguláció)

ESP1 protein (*S. cerevisiae*; testvérkromatidák szétválása és a szegregáció)

A legkifejezettebb homológiát a *S. pombe cut1* gén által kódolt fehérjével találtunk. Ez arra ösztönzött minket, hogy megnézzük, vajon a *S. pombe cut1* génnek van-e ARS-funkciója *S. japonicus*-ban?

4.1.19. Transzformálás *S. pombe cut1* génnel

A transzformálásokhoz a pCUT1-9 plazmidot használtuk, mely tartalmazza a teljes *cut1* gént *S. cerevisiae* *LEU2* marker mellett. Transzformáltuk a *S. japonicus* 7-63 *leu3-10 myc-4* mutánsát. Az 15. táblázat négy transzformálás eredményeit tartalmazza:

	Telepszám	Plazmidvesztés
1. transzformálás	14	nincs
2. transzformálás	0	nincs
3. transzformálás	3	nincs
4. transzformálás	54	nincs

15. táblázat

S. japonicus transzformálása a *cut1* gént tartalmazó pCUT1-9 plazmiddal

A kapott transzformáns telepek egyik esetben sem mutattak plazmidvesztést, tehát a bekerült plazmid valószínűleg beintegrálódott a kromoszómába. A *S. pombe cut1* génje tehát - mint ahogy a csekély DNS-szintű hasonlóság miatt sejthető volt - nem képes ARS funkciót kifejteni *S. japonicus*-ban. A kísérletből azonban egyértelműen kiderül, hogy a *S. japonicus* 7-63 *leu3-10* mutánsa nem csak a *S. pombe leu1* génnel komplementálható, hanem annak homológjával, a *S. cerevisiae* *LEU2* génnel is.

4.1.20. A 2,5 kb-os fragment szekvenciája

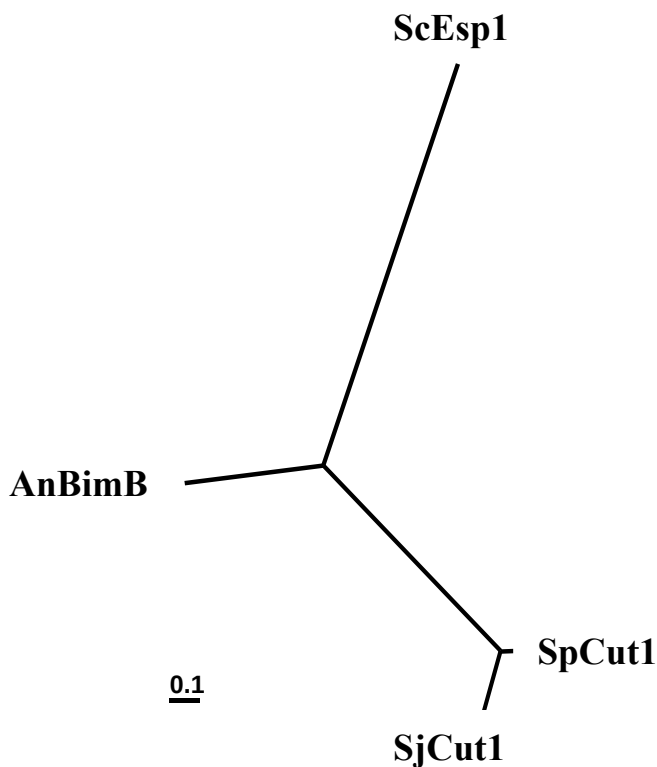
Az 1,5 kb-os fragmenttel talált *cut1* homológia azt mutatta, hogy a *cut1* rendkívül nagy ORF-jéből (open reading frame) a homológ *S. japonicus* 1,5 kb-os genomiális fragment csak töredéket tartalmazott (a gén elejét). Arra gondoltunk, hogy a gén folytatását a másik, 2,5 kb-os fragmenten megjeljük és így birtokunkban lesz az első teljes *S. japonicus* gén, melynek homológját ismerjük. Ezért megszekvenáltattuk ezt a 2,5 kb-os szakaszt is, de meglepetésünkre egy, a *S. japonicus*-ban már leírt riboszómális DNS kódját adta. A 2,5 kb-os genomiális inzertdarab tehát csak véletlen kapcsolódás révén került a génkönyvtár izolált plazmidjában a *cut1* homológ 1,5 kb-os szakasz mellé.

4.1.21. Rokonsági kapcsolatok a homológiák alapján

Az 1,5 kb-os fragmentünkkel homológ fehérjék konzervatív régióinak aminosavsorrendjét összehasonlítva rokonsági kapcsolatokra következtethetünk azon fajok között, amelyekre homológiát találtunk (lásd: anyagok és módszerek) (28. ábra).

Mivel a szekvenciánkból levezetett fehérje konzervatív része a legnagyobb homológiát a *S. pombe cut1* proteinnel adta, a *S. japonicus* és a *S. pombe* közti szoros rokonság egyértelmű. Meglepőbb viszont, hogy ilyen alapon a *S. japonicus* az *Aspergillus nidulans*-sal közelebbi rokonságban áll, mint a *S. cerevisiae*-vel. A feltételezett evolúciós távolságokat az 28. ábra mutatja:

28. ábra



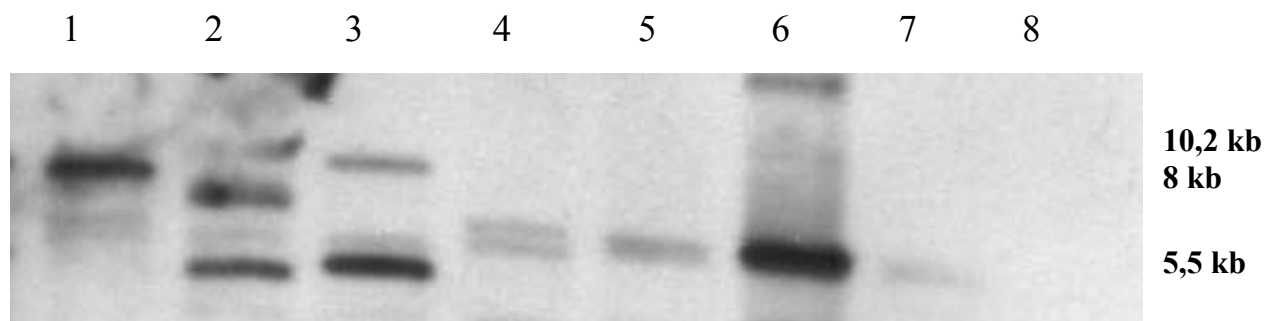
Rokonsági kapcsolatok az egyes fajok között a Cut1-szerű fehérjék aminosav-sorrendjeiben tapasztalt hasonlóságot alapul véve. E számítások alapján a morfológiailag is nagyon hasonló *Schizosaccharomyces pombe* a *Schizosaccharomyces japonicus* közeli rokona, míg meglepő módon az *Aspergillus nidulans* közelebb áll a *Schizosaccharomyces japonicus*hoz mint a szintén élesztőgomba *Saccharomyces cerevisiae*. A képen feltüntetett méretarány az 1 %-os aminosav-eltérésnek megfelelő genetikai távolságot jelképezi.

Jelölések:

- Sj:** *Schizosaccharomyces japonicus*
- Sp:** *Schizosaccharomyces pombe*
- An:** *Aspergillus nidulans*
- Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.22. Az integratív transzformálás bizonyítása

A génkönyvtárral való transzformálások során kaptunk olyan transzformánsokat is, melyek nem mutattak plazmidvesztést. Arra következtettünk, hogy ezek valószínűleg integratív transzformánsok, azaz a plazmid valamely, a genommal mutatott homológián keresztül beépülhetett a kromoszómába és ezzel együtt replikálódott. Ennek bizonyítására Southern Blot technikával kimutattuk a beintegrálódott plazmidot ezen telepek genomjaiban (lásd: anyagok és módszerek). A 29. ábrán látható blotkép azt mutatja, hogy valóban megtörtént az integráció ezen telepekben, ám van olyan telep, ahol ezt nem tudtuk bizonyítani. Az integratív törzsek által adott többféle sáv azzal magyarázható, hogy a plazmid a *leu1*-es markerén és a belekerült genomiális inzerten keresztül is beintegrálódhatott homológ módon. A 4. és 5. minta nem adott sávokat, tehát ezek lehetnek backmutánsok is, de mivel a 7-63-as törzs egyáltalán nem hajlamos backmutációra, sokkal valószínűbb, hogy ezek olyan integratív transzformánsok, melyeknél kettős rekombinációs esemény révén csak a homológ szakasz került be, ezáltal a plazmid bakteriális régiójára tervezett oligonukleotiddal az integráció nem detektálható.



29. ábra

Southern Blot hibridizációs módszerrel készült felvétel az integráció kimutatására.

1. *S. pombe* 0-32 integráns 2. – 3. – 6. *S. japonicus* 7-63 integránsok 4. – 5. *S. japonicus* 7-63 nem detektálható integráció: ezek a transzformánsok vagy nem integránsok, vagy backmutánsok 7. *S. japonicus* 7-1 kontroll 8. *S. pombe* 0-32 kontroll

4.1.23. Transzformációs hatásfokok

A transzformálás során kapott telepszámokból következtetni tudunk a transzformációs hatásfokokra *S. japonicus*-nál integratív és replikatív transzformálások esetén. A transzformált sejtenyészet OD (optical density) értékéből számolva a transzformált sejtek számát 10^8 -ra vonatkoztattuk, míg DNS-méréssel meghatároztuk a bejuttatott DNS mennyiségét és azt $10 \mu\text{g}$ -ra vonatkoztattuk. Az így kapott telepszám-értékeket alapján össze tudtuk hasonlítani a *S. pombe* és *S. japonicus* transzformációs hatásfokát (16. táblázat). Látható, hogy a *S. pombe* 0-38 *leu1-32* mutánsának integratív transzformációja tízszer olyan hatékony mint a *S. japonicus* 7-63 *leu3-10 myc-4* mutánsáé. Az izolált fajazonos ARS-t tartalmazó plazmidokkal történő replikatív transzformáció pedig 10x - 20x több telepet eredményezett *S. japonicus*-ban mint az integratív.

A replikatív transzformáláskor is kaptunk néha kis százalékban integratív telepeket. A transzformálás után egy héttel megjelennek az integratív transzformánsok telepei. További 1,5-2 hét elteltével kezdenek el növekedni a replikatív transzformánsok telepei sok-sok kis tühegynyi telep formájában, melyek egy bizonyos méret elérése után nem is növekszenek tovább.

Transzformáló plazmid	Kapott telepek száma
Integratív transzformálás <i>S. pombe</i>-ban (0-32 <i>leu1-32</i> mutáns törzs)	
pJK 148 genomiális inzerttel	1. transzformálás: 32 2. transzformálás: 29 3. transzformálás: 24 4. transzformálás: 27
Integratív transzformálás <i>S. japonicus</i>-ban (7-63 <i>leu3-10 myc-4</i> mutáns törzs)	
pJK 148 (<i>leu1</i> markerrel)	1. transzformálás: 2,9 2. transzformálás: 2,1
pCUT1-9 (<i>LEU2</i> markerrel)	1. transzformálás: 2,6 2. transzformálás: 4,7
Replikatív transzformálás <i>S. japonicus</i>-ban (7-63 <i>leu3-10 myc-4</i> mutáns törzs)	
pJK 148 genomiális inzerttel	37,5
pJK 148 1,5 kb-os fragmenttel	1. transzformálás: 17,3 2. transzformálás: 13,6
pJK 148 1,5 kb-os fragmenttel	1. transzformálás: 38 2. transzformálás: 44,8

16. táblázat
Transzformációs hatások

4.1.24. A hipotetikus ARS szerepe *S. pombe*-ban

A hipotetikus *S. japonicus* ARS-t tartalmazó pJK 148 plazmidokkal transzformáltuk a *S. pombe* 0-1 *leu1-32* mutánsát is és ellenőriztük a transzformáns telepek plazmidvesztését. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy ezen transzformánsok egy része, (kb. 25%-a) szintén mutatott plazmidvesztést, a vesztesi teszt értéke 2-3 %. Ebből arra következtettünk, hogy a *S. japonicus*-ból származó feltételezett ARS szekvenciát kismértékben a *S. pombe* is képes volt ARS-ként alkalmazni, amit alátámaszt a szekvenciában talált *S. pombe* ARS konszenzus régió is (lásd: szekvencia).

4.1.25. A hipotetikus *S. japonicus* ARS alkalmazása

A *S. japonicus* genomból izolált feltételezett ARS-t felhasználtuk egyéb típusú *S. japonicus*-transzformációkhoz is.

A *S. pombe*ban - akárcsak a *S. japonicus*ban - van egy vad típusban is megjelenő auxotrófia, az inozitol-igény. Indiai kutatóknak sikerült vad típusú *S. pombe* törzseket transzformálniuk olyan plazmiddal (ABE 608), mely az önálló inozitolszintézisre képessé tevő gént tartalmazott. Ezt a plazmidot elkértük és beleépítettük a feltételezett *S. japonicus* ARS-t tartalmazó 1,5-ös fragmentet. Ezzel és az eredeti plazmiddal (ABE 608) is transzformáltuk a vad típusú 7-1-es *S. japonicus* és inozitol nélküli EMMA táptalajra szélesztettünk. A transzformálás eredményes volt (17. táblázat) ám csupán apró, tűhegynyi telepeket kaptunk, melyeknek sejtjeit mikroszkóposan megvizsgálva szabályos, egészséges *S. japonicus*-sejteket láttunk. A telepek csak rövid ideig voltak fenntarthatóak, gyorsan elpusztultak. A negatív kontroll csészéken sosem kaptunk telepnövekedést. Mindezekből arra következtettünk, hogy a transzformáció sikeres volt (az ARS kifejtette hatását) ám az inozitol-auxotrófiát komplementáló gén nem volt teljesen működőképes *S. japonicus*ban, terméke csak pár sejtciklusig volt képes a sejteket szelektív táptalajon fenntartani.

	Telepszám	Kontroll
1. csésze	90 tűhegynyi telep	0 telep
2. csésze	480 tűhegynyi telep	0 telep
3. csésze	500 tűhegynyi telep	0 telep
4. csésze	65 tűhegynyi telep	0 telep

17. táblázat

Kapott telepek száma a *S. japonicus* 7-1 ABE 608-cal való transzformálása után

4.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*-ról már korábban leírták, hogy vegetatív életciklusa dimorfizmust mutat, azaz egysejtű élesztő és többsejtű micéliáris alakok váltják benne egymást (Sipiczki és tsi., 1998 a). E növekedési fázisok közti átmenetet a környezetből érkező szignálok szabályozzák és feltétele a bipoláris növekedésről (élesztő forma) az unipoláris növekedésre (micéliáris, hifaalak) való reverzibilis áttérés (Sipiczki és tsi., 1998 b). A *S. japonicus* élesztőfázisa nagyfokú morfológiai hasonlóságot mutat a *Schizosaccharomyces pombe* vegetatív alakjával, de micéliáris, fonalas megjelenési formájának nincs megfelelője *S. pombe*-ban. Ebben az értekezésben bemutatjuk, hogy a *S. japonicus* haploid életciklusa az *S. pombe* megfelelő ciklusához rendkívül hasonló (Egel, 1994). Vegetatív sejtjei haploidok, majd nitrogénéhezés hatására konjugálnak és diploid zigótát képeznek. A zigóta azonnal meiózison megy keresztül és haploid spórákat tartalmazó aszkuszt hoz létre (zigotikus aszkusz). A *S. japonicus*nak természetes körülmények között nincs diploid vegetatív sejtjes állapota, mivel a zigóta rövid életű, nem osztódik mitotikusan és azonnal végbemegy benne a meiózis; tehát diploid állapota csupán e rövid életű zigótára korlátozódik. A diploid állapotot mesterségesen fenntarthatjuk protoplasztált haploid sejtek indukált fúziójával, ám az így létrehozott diploid vegetatív sejtek instabilak és csak olyan tápközegen tarthatók fenn, amely nem teszi lehetővé a spórázást (pl. nitrogénben gazdag táptalajon). A diploid sejtek is mutatnak dimorfizmust: mind az élesztőből micéliáris alakba, mind micéliáris alakból élesztőbe történő átalakulás végbemehet bennük, ugyanúgy, mint a haploid sejteknél.

Citológiai szempontból vizsgálva a különbségeket és hasonlóságokat az egysejtű élesztő és a többsejtű micéliáris alak között érdekes jelenségre lettünk figyelmesek a mitózis tekintetében: a hifákban a magosztódás utolsó fázisában a magvak ellentétes irányba csúcsosodtak ki. Élesztősejteknél ilyen nem, vagy csak rendkívül enyhe mértékben tapasztaltunk, tehát elképzelhető, hogy a magvak kicsúcsosodása a hifasejt intenzív megnyúlásából eredő torzító hatás eredménye, de feltételezhető az is, hogy SPB (spindle pole body), vagy ahhoz hasonló citoplazmatikus organelum "húzza" a magvakat, hasonlóképpen, ahogy azt *S. pombe*-ben megfigyelték (Chikashige és tsi., 1994).

Pulzáló erőterű gélelektroforézissel megjelenítettük a *S. japonicus* kromoszómáit. A 7-65-ös törzs esetében sikerült kimutatnunk, hogy a *S. japonicus*-nak a *S. pombe*-hoz hasonlóan három kromoszómája van. Egy ezek közül a *S. pombe* legkisebb kromoszómájához hasonló méretű (3,3 mb), egy a *S. pombe* legnagyobb kromoszómájának megfelelő méretű (5,3 mb), egy pedig egy jóval nagyobb, (kb. 8,3 mb) méretű kromoszóma.

Ebben az értekezésben beszámolunk továbbá olyan mutánsok létrehozásáról - anyagcsere (auxotróf) illetve morfológiai (myc) mutánsok - melyeket megfelelő markerekként tudtunk alkalmazni a genetikai kísérletekben. Minden, általunk mutagenézissel létrehozott marker a mendeli törvényeknek megfelelő, a nyolcspórás aszkuszt létrehozó gombákra jellemző 4:4

szegregációs mintázatot mutatta. Egyéb más, nyolcspórás tömlősgombákhoz hasonlóan ezen nyolc spóra alkalmas genetikai analízisre: az aszkuszkok elkülönítésével és a spórák mikromanipulációjával értékes információkat nyerhetünk a meiózis során végbement rekombinációs eseményekről. Ugyanakkor a törzsek homotallikussága az egyes törzsek keresztezéséből származó eredmények genetikai analízisét igen körülményessé és gyakran értékelhetetlenné teszi, mivel a törzsek keresztezése során gyakori az önkonjugáció (a sejtek azonos törzsön belül egymással is konjugálnak, nemcsak a partnerrel). Az ebből származó fals adatok elkerülése végett a hagyományos keresztezés helyett protoplaszt fúzió alkalmazását láttuk célszerűnek. A már korábban a *S. pombe* leírt fúziós módszer (Sipiczki és Ferenczi, 1977) kitűnően alkalmazható volt *S. japonicus*nál is. A fuzionált törzsekből származó diploid heterozigóta a szülői markerekre és nitrogénszegény, spóráztató táptalajon nyolc haploid spórát tartalmazó aszkuszt képez (azigotikus aszkusz). Az így létrejött aszkuszkok elkülöníthetők, a belőlük felszabaduló spórák mikromanipulációval egymástól szeparálhatók (oktád analízis). Mivel a diploid sejtek nitrogéndús táptalajon nem képeznek spórát, a diploid fúziós terméket recesszív mutációk komplementációs analíziséhez is használhatjuk. Ezt a vizsgálati módszert kihasználva lehetőségünk nyílt az általunk izolált auxotróf törzsek 27 csoportba, a myc^{-} mutánsok 2 csoportba való sorolására. A meghatározott csoportok valószínűleg géneknek felelnek meg. A markerek szabályos szegregációja az oktádokban lehetővé tette számunkra hogy rekombinációs gyakoriságot, ezáltal kapcsoltsági viszonyokat határozzunk meg az egyes markerek között. Két kapcsoltsági csoportot sikerült így beazonosítanunk, egyik csoportban a gének valószínű sorrendiségére is sikerült következtetnünk (*ura4 - arg1 - arg2 - arg4*).

Sikerült beazonosítani az egyes auxotróf csoportok hozzávetőleges helyét a megfelelő bioszintetikus útvonalban a csoportba tartozó törzsek adott köztitermékeken való növekedését figyelve. A négy ade^{-} csoportból kettő, a 3-as és 4-es csoport ($ade3^{-}$ és $ade4^{-}$) piros pigmentációt mutatott, piros színű pigment pedig a *S. pombe ade6* mutánsában és az attól későbbi adeninszintetikus lépéseket katalizáló gének mutánsaiban jelenik meg, ezért a fent említett csoportok a *S. pombe ade6*, *ade7* és *ade8* génjeivel lehetnek homológok (Kohli, 1987). Az 1-es csoport tagjai ($ade1^{-}$) pedig, melyek nem nőnek inozin 5'-monofoszfáton (IMP), valószínűleg a szintézisút egy kései génjében érintettek, tehát a *S. pombe ade2* vagy *ade8* génjével lehetnek funkcionális homológok. Az arg^{-} mutánsokat hét csoportba soroltuk. A *S. pombe*-ben 11 *arg* gént találtak az arginin auxotróf törzsek komplementációs csoportosítása alapján (Kohli, 1987). A *S. japonicus* 7-116 *arg1-21* mutáns ornitinnel vagy glutaminnal kiegészített minimál táptalajon mutatott növekedést, tehát a *S. pombe arg1* mutánsával lehet homológ (Vissers és Thuriaux, 1985). Meglepő azonban, hogy sem ez, sem a többi arg^{-} csoport nem növekedett citrullinon, a bioszintetikus útvonal egy késői intermedierjén. A negatív eredmény valószínűleg azzal magyarázható, hogy a *S. japonicus* sejtek nem képesek a citrullin táptalajból való felvételére. A négy leu^{-} csoportot nem teszteltük bioszintetikus intermedierekre. A molekuláris kísérletekben azonban a 7-63 *leu3-10 S. japonicus* leucin auxotróf törzs sikeresen komplementálható volt a *S.*

pombe leu1 génjével, illetve az annak *S. cerevisiae*-ben megfelelő *LEU2* génnel. Ezek az eredmények pedig arra engednek következtetni, hogy a *S. japonicus leu3* valószínűleg β -izopropilmalát dehidrogenázt kódol. A gombák sajátos, egyedülálló α -amino-adipát útvonalat fejlesztettek ki a lizinbioszintézisre. *S. pombe*-ben a szintetikus útvonal hét enzimatis lépésből áll (Ye és Bhattacharjee, 1988), melyet legkevesebb kilenc gén kódol (Kohli, 1987). A *S. japonicus lys⁻* mutánsait nyolc nem allélikus csoportba tudtuk sorolni, mely nyolc *lys* gént jelenthet. Ezek közül három, a *lys4*, *lys5* és *lys6* az α -amino-adipinsav előtti lépések valamelyikében szerepelhet. Az *ura⁻* mutánsokat 4 csoportba soroltuk be, melyek a *S. pombe* négy vagy öt *ura* génjének felelhetnek meg (Kohli, 1987). Azok a csoportok (1-es és 2-es csoport), melyekbe tartozó *ura⁻* törzsek növekedést mutattak orotáton, valószínűleg a *S. pombe ura1*, *ura2* vagy *ura3* gének mutáns alléljeivel homológok. Azok az uracil auxotróf mutánsok pedig, melyeket 5'-FOA segítségével izoláltunk, azonos komplementációs csoportba sorolhatók voltak (4. komplementációs csoport), ami azt mutatja, hogy a 5'-fluoro-orotát rezisztencia az uracilszintézis egyik meghatározott génjének mutációjához köthető, akárcsak más fajokban (Worsham és tsi., 1988; Lee és tsi., 1988). *S. pombe* esetén ez a rezisztencia az orotidin-5'-foszfát dekarboxiláz enzimet kódoló *ura4*-es génhez köthető (Boeke et al., 1984), mely homológ az *S. cerevisiae URA3* génjével. Így feltehető, hogy az általunk 4-es csoportba besorolt mutánsok a *S. pombe ura4* (*S. cerevisiae URA3*) gének mutánsaival mutatnak homológiát. Ez esetben pedig erősen valószínű, hogy a *S. japonicus* uracil auxotróf 3-as csoport (*ura3⁻*) az *ura5* génnel lesz homológ, hiszen e csoportról tudjuk, hogy mutáns alléljai az orotát $\rightarrow$ uridin-5'-monofoszfát átalakítási folyamatban hibásak. A kísérletek során az egyes *S. japonicus* auxotróf csoportokkal más fajokban talált homológiákat a 18. táblázat foglalja össze.

<i>S. japonicus</i> auxotróf csoport	Homológia
<i>ura4⁻</i>	<i>S. pombe ura4</i>
<i>ura3⁻</i>	<i>S. pombe ura5</i>
<i>arg1⁻</i>	<i>S. pombe arg1</i>
<i>leu3⁻</i>	<i>S. pombe leu1</i> <i>S. cerevisiae LEU2</i>

18. táblázat

Az egyes *S. japonicus* auxotróf csoportokkal más fajokban talált homológiák

Az izolált myc mutánsok genetikai hátterét is vizsgáltuk. A törzsek között páronként végzett protoplaszt fúziók és a fúziós termék meióziséból származó utódok micéliumképzési sajátosságainak vizsgálata révén a myc mutánsokat is csoportokba rendeztük, ahol az egyes csoportok valószínűsíthetően géneknek felelnek meg. Mivel ez alapján az összes, vizsgált myc⁻ törzs különböző csoportba volt sorolható, azaz minden törzsnél különböző gén hibájára volt

visszavezethető a fenotípus, arra lehet következtetni, hogy többé-kevésbé gyengült hifanövekedést számos, a legkülönbözőbb típusú intracelluláris folyamat meghibásodása eredményezhet, tehát ilyenkor a micéliumképzési sajátság csak közvetetten sérül, ahogy erre már más fajoknál publikált adatok is rámutattak (Cali és tsi., 1998). Ezt a myc^- mutánsok morfológiájának sokfélesége is alátámasztja. Ezzel szemben a vizsgált, három myc^- törzsnél csak két csoportot, azaz ennek megfelelően két gént találtunk. Ebből arra következtettünk, hogy e mutáns fenotípus kialakulásában kevesebb gén játszik szerepet, tehát a micéliumnövesztésre teljesen képtelen törzsek vizsgálatával kell keresnünk azokat a géneket, melyek közvetlenül szerepet játszanak a dimorf átalakulás elindításában, a hifanövesztés indukálásában. A különböző génben sérült myc^- törzsek fúziójából származó diploidok, hasonlóképpen a myc^- és myc^{++} törzsekből létrehozott diploidok mutatták a valódi komplementáció jelenségét, tehát a vizsgált myc^- és myc^{++} allélek recesszívek, jelenlétük a vad allél mellett nem befolyásolja kedvezőtlenül a micéliumképzést. A kettős mutánsok ($myc^- myc^{++}$) fenotípusa pedig myc^- -nek bizonyult, amiből arra a következtetésre jutottunk, hogy a myc^- lókuszt episztatikus a myc^{++} lókuszt felett.

A myc^- és myc^- mutánsok ($myc^{-/-}$) citológiai vizsgálatok a legtöbb mutáns törzsben vad típushoz képest eltérő vakuoláris mintázatra bukkantunk. A vad sejtekben megfigyelt néhány nagyobb, fuzionált vakuólum helyett sok kis egyforma méretű, apró vakuólum töltötte ki a citoplazmát. Azt, hogy ez a jellegzetes vakuoláris mintázat összefügg a myc mutációval nemcsak a myc^- és myc^- mutánsokban szignifikánsan gyakoribb előfordulás teszi valószínűvé de tovább erősíti az a megfigyelés is, hogy az azonos génben sérült myc^- mutáns törzsek is ezt a vakuoláris képet adták teljesen azonos mintázattal. Homotipikus vakuólumfúzióban sérült mutánsoknál megfigyelték, hogy a vakuólumok összeolvadásának elmaradása úgynevezett fragmentált vakuoláris morfológiához vezethet (Raymond, 1992), mely hasonló az általunk a myc^- és myc^- mutánsokban megfigyelt mintázathoz. Mivel a vakuólumok egy nagy, proximális vakuólummá történő fúziója a dimorf átalakulás első lépéseinek egyike (Sipiczki és tsi, 1998 b), ezért a $myc^{-/-}$ mutáns morfológia egyik lehetséges magyarázata, hogy a myc^- és számos myc^- mutánsnál ez a folyamat elmarad, tehát a myc mutáció következményeként nem játszódik le. A myc mutáció nem feltétlenül a vakuólumok fúzióját gátolja, hanem elképzelhető, hogy sokkal korábbi molekuláris eseményeket, melyek később a vakuólumok fúziójáig vezetnének.

Teszteltük myc mutánsainkat olyan toxikus anyagra (koffein), melyről tudjuk, hogy megfelelő koncentrációban gátolja a micéliumképzést (Sipiczki és tsi, 1998 b). Nem találtunk szignifikáns eltérést egyetlen myc mutáns koffeinérzékenységét tekintve sem a vad típushoz képest; ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a meglevő myc mutációk nem valamely, a koffein hatásmechanizmusával közös útvonal révén befolyásolják a hifaképződést. A kérdést fordított módon is megközelítettük: koffeinrezisztens mutánsokat izoláltunk és ezek micéliáris sajátságait vizsgáltuk. Ezek között egyetlen alkalommal sem leltünk myc morfológiát mutató törzset, tehát a myc morfológia koffeinrezisztenciával való összefüggésére nem találtunk bizonyítékot.

Számos esetben megfigyelték, hogy sejtmorfológiai változások gyakran együttjárnak a citoskeletáris rendszer hibáival (Cali és tsi., 1998 ; Raudaskoski és tsi., 1994; Richards és tsi., 2000; That és tsi., 1985). *S. pombe* pszeudomicéliumot képző *sep1-1* szeptációs mutánsánál például a citoskeleton módosult, ezáltal a sejtek enyhén rezisztensebbek a benomylra, egy antitubulin fungicid toxinra (Sipiczki és tsi., 1993). A *S. japonicus* myc mutánsainál azonban nem találtunk szignifikáns benomylérzékenységet a vad típushoz képest, tehát ebből feltételezhető, hogy egyiknél sem a citoskeletáris rendszer hibájára vezethető vissza a mutáns fenotípus.

A *S. japonicus* mutánsainak transzformálására irányuló törekvéseink kezdetben sorozatos kudarcot mutattak. Mivel ezeket a transzformálásokat *S. pombe* és *Saccharomyces cerevisiae* autonóm replikációs szekvenciát (ARS) tartalmazó plazmidokkal végeztük, arra a következtetésre jutottunk, hogy sem a *Saccharomyces cerevisiae* 2µm plazmidjának origója, sem az *S. pombe* *ars1* szekvencia nem tud replikációs origóként működni *S. japonicus*-ban. Mivel a replikációs origó fogalma még mindkét fajban vitatott (Bielinsky és Gerbi, 2001), ezen ARS-szekvenciák hatástalansága *S. japonicus*-ban nem feltétlenül jelenti azt, hogy a *S. japonicus* egyáltalán nem képes ezek felismerésére. Tehát a domináns markerekként szolgáló rezisztenciagéneket tartalmazó pBEJ16 és pBG1 plazmidokkal történő *S. japonicus* transzformálások kudarcra azzal lehet magyarázható, hogy ezek a markerek nem megfelelő mértékben expresszálódnak a *S. japonicus*-ban. Más fajban is előfordult már (*Dipodascus magnusii*), hogy a vizsgált faj az ismert transzformációs plazmidok ARS szekvenciáit nem tudta alkalmazni, ezért a faj saját genomjában kerestek ARS-t megfelelő transzformációs rendszer létrehozásához (Adamicová és tsi., 1998). Ennek alapján mi is ehhez a módszerhez folyamodtunk. Így módon találtunk és klónoztunk meg egy 1,5 kb hosszú genomiális szakaszt, mely enyhe ARS-ként viselkedett *S. japonicus* transzformálásakor. A megklónozott *S. japonicus* kromoszómális szekvencia lehetővé teszi a bekerült plazmid autonóm replikációját mindkét vizsgált hasadóélesztőben (*S. pombe*, *S. japonicus*), tehát valószínű, hogy ezen fajok replikációs origója szerkezeti hasonlóságokat mutat. *S. pombe* - ben két konszenzus szekvenciát találtak az ARS elemekben: egy 11 bp hosszúságú motívumot (A/T)(A/G)TTTATTTA(A/T) (Maundrell et al., 1988), - ami erős hasonlóságot mutat a *Saccharomyces cerevisiae* ACS-val (ARS consensus sequence), ezért PACS-nak nevezték el - és egy variábilisabb nukleotidszekvenciát (A/T)(A/T)TT(A/T)TT(A/T)TT (Zhu et al., 1994). A megklónozott *S. japonicus* fragment ezen szekvenciák közül egyikkel sem mutat teljes azonosságot nukleotidsorrendjét tekintve. Leghosszabb A/T régiója a TTATTTAAA, melyet egy GG választ el az ezt követő AAAAAA nukleotidoktól. Ez az oligonukleotid mutat leginkább szekvenciahasonlóságot a PACS-val. Mostanában végzett vizsgálatok alapján azonban kiderült, hogy ezen konszenzus szekvenciák az *S. pombe*-ben valószínűleg - szemben a *S. cerevisiae* ACS-val - nem esszenciális részei a replikációs origónak (Clyne és tsi., 1995). Például, a (A/T)(A/G)TTTATTTA(A/T) motívum teljes kivágása nem gyengíti az ARS aktivitást és nem is minden ARS szekvenciában található meg (Okuno és tsi., 1999; Clyne és tsi., 1995). Azt tartják valószínűnek, hogy az ARS aktivitásért *S. pombe*-ban egy meghatározott, specifikus nukleotidsorrendű szakasz helyett olyan

szekvenciák lehetnek felelősek, melyek akár 1 kb hosszúságúak is lehetnek, A/T nukleotidokban gazdagok és sokszoros, replikációs enhanszer-régiók találhatók rajtuk (Okuno és tsi., 1999; Clyne és tsi., 1995). Valószínűnek tartjuk, hogy az általunk klónozott *S. japonicus* kromoszómális szakasz bizonyos fokig hasonlít ehhez a struktúrához, ezáltal kis hatékonysággal lehetővé teszi a replikáció iniciálását mindkét hasadóélesztőben. Gyenge ARS aktivitásának köszönhetően a transzformánsok lassan növekszenek és nagymértékű instabilitást mutatnak. Elgondolkodtató azonban, hogy ha az általunk talált, ARS-hatású *S. japonicus*-szekvencia kismértékben a *S. pombe*-ban is működőképes volt, a *S. pombe* ARS-e miért nem alkalmas az *S. japonicus* számára. Erre az lehet a válasz, hogy egy adott faj genomjában rendkívül sokféle típusú ARS található, melyek szekvenciáikban csekély hasonlóságot mutatnak (Clyne és tsi., 1997). Elképzelhető, hogy a transzformációkhoz alkalmazott plazmidok (pURN18 , pJDB 207, pEVP11, pBEJ16) egy, azt általunk találttól eltérő típusú *S. pombe* ARS-t tartalmaznak.

A megklónozott, ARS aktivitást mutató genomiális fragment összehasonlító szekvenciaanalíziséből kiderült, hogy feltételezett transzlációs termékének aminosav-szekvenciája nagymértékű hasonlóságot mutat a *S. pombe* Cut1 fehérjééhez. A Cut1 egy magorsóhoz kapcsolódó mitotikus fehérje és esszenciális szerepet játszik a testvérkromatidák szétválásában (Yanagida, 1998). Funkcionális homológjai magasabbrendűekben a szeparinok (Amon, 2001). A Cut1- hez hasonló aminosav-szekvenciájú fehérjéket *Saccharomyces cerevisiae*-ben és *Aspergillus nidulans* -ban is leírtak (May és tsi., 1992; McGrew és tsi., 1992). A *S. japonicus* a negyedik olyan gombafaj, melyben Cut1-szerű fehérjét találtak. Annak ellenére, hogy a klónozott fragment nem tartalmazza a teljes gent, feltételezett transzlációs terméke elég hosszú ahhoz, hogy filogenetikai összehasonlításokhoz alapul szolgálhasson. Mint ahogy az erős morfológiai és fiziológiai hasonlóság alapján azt előre sejtettük a hasadóélesztők szekvenciái közelebbi hasonlóságot mutattak egymással mint bármelyik másik két fehérjével. Érdekes módon azonban mindkettő inkább az *Aspergillus* megfelelő fehérjéével mutatott erősebb hasonlóságot, mint a *Saccharomyces cerevisiae* proteinnel. Ez az eredmény megerősíti a korábbi feltevést, mely nukleotidszekvencia-összehasonlítások alapján hatalmas filogenetikai távolságot sejtetett a *S. pombe* és a *Saccharomyces cerevisiae* között (Sipiczki, 2000).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy ebben az értekezésben bemutatjuk, hogy e még kevésbé alkalmazott modellszervezet, a homotallikus hasadóélesztő *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* egyaránt alkalmas klasszikus genetikai és molekuláris biológiai vizsgálatokra. Leírjuk benne az - elsőként általunk izolált - genetikai markerekként szolgáló mutációkat, melyek szabályos szegregációt mutatnak és alkalmasak protoplaszt fúzióval végzett hibridizációkhoz illetve mikromanipuláció révén októanalízishez. Vizsgáljuk a *S. japonicus*ból származó elsőként megklónozott olyan szekvenciát, mely replikációs origóként működik transzformációs plazmidokban. Ez a genomiális fragment a *S. pombe* Cut1 proteinjével mutat erős homológiát és valószínűleg a *S. japonicus* kromoszómán nem ARS szerepet tölt be. Törekszünk ezért arra, hogy újabb, pontosabb génkönyvtár segítségével aktívabb ARS funkcióval rendelkező

fragmentet klónozzunk a *S. japonicus* genomból, mellyel hatékonyabb transzformációs vektort tudnánk létrehozni e faj számára.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* az élesztőgenetikai kutatásokban még kevésbé ismert modellszervezet. A vele való klasszikus genetikai és molekuláris munka alapjait le kellett fektetni. Ebben segítségünkre volt az, hogy A *S. japonicus* morfológiailag és fiziológiailag is nagyon hasonló a genetikai kutatásokban már rutinszerűen alkalmazott *Schizosaccharomyces pombe*-hoz. A **szoros rokonsági kapcsolatot** a két faj között az általunk izolált *S. japonicus*-szekvencia molekuláris analízise is megerősítette.

A genetikai munkákhoz kiváló markereként szolgáló **auxotróf** mutánsokat elsőként mi izoláltuk vad típusú 7-1 törzsből. Az izolált mutáns törzseket csoportokba rendeztük, ahol egy adott csoportba tartozó törzsek ugyabban a génben sérültek, tehát egy adott auxotróf fenotípushoz talált csoportok száma a szintézisútvonalban résztvevő gének minimális számát adja meg. Anyagcsere-köztitermékek felhasználásával meghatároztuk az így talált auxotróf gének hozzávetőleges helyét a szintézisútvonalban. Egyes csoportok helye - jellegzetes tulajdonságaik alapján - egészen pontosan meghatározható volt, így beazonosíthattuk, melyik *S. pombe* génnel **homológok**. Ez alapján úgy találtuk, hogy a *S. japonicus* 4-es uracil auxotróf csoportja a *S. pombe* *ura4* génjével, a *S. japonicus* 3-as uracil auxotróf csoportja a *S. pombe* *ura5* génjével, illetve az *S. japonicus* 1-es arginin auxotróf csoportja pedig a *S. pombe* *arg1* génjével homológ. További egy homológiát molekuláris módszerrel, a transzformálások során sikerült találnunk. Ez alapján a *S. japonicus* 7-63 *leu3-10* törzsben talált mutáció a *S. pombe* *leu1* génnel és annak homológjával, a *S. cerevisiae* *LEU2* génnel is komplementálható volt. Tehát a *S. japonicus* 3-as leucin komplementációs csoportja ezekkel a génekkel homológ.

Összehasonlításokat végeztünk a két morfológiai állapot (egysejtű élesztő és többsejtű hifaalak) között **citológiai** szempontból. Nem találtunk szembetűnő különbséget a kétféle alak mitotikus osztódásának egyes lépéseit tekintve. A hifáknál a sejtmagvak az osztódás terminális fázisában ellentétes irányban, a sejtek végei felé csúcsosodnak ki, mely valószínűleg a hifasejt intenzív megnyúlásából származó torzító hatásnak köszönhető. A fluoreszcens magfestés során megfigyelt három kromoszóma meglétét pulzáló erőterű gélelektroforézissel (CHEF) is bizonyítottuk.

Mivel a *S. japonicus* szexuális viselkedését tekintve homotallikus (párosodási típusát mitotikus ciklusonként váltogatja) ezért másik törzzsel való keresztezéskor az azonos telepben is történik konjugáció a sejtek között, mely megzavarhatja az eredményeket. Ennek elkerülése végett próbálkoztunk az *S. pombe*-ra kidolgozott **protoplaszt fúziós** módszerrel ennél a fajnál. Sejtjei könnyen protoplasztálhatónak voltak, a fúziós módszer eredményesnek bizonyult, ezért minden további keresztezést így végeztünk. Heterotallikus mutáns izolálására irányuló törekvéseink sikertelenek maradtak.

Az élesztő-micéliális morfológiai átalakulás genetikai és citológiai jellemzőinek megismeréséhez **myc** (micéliális) mutánsokat is izoláltunk. Izoláltunk a vad 7-1 törzshöz képes gyengült hifaképzésű (myc^-), hiperaktív hifaképzésű (myc^{++}) törzseket sőt olyanokat is, melyek hifaképzésre tökéletesen képtelenek voltak ($myc^{- -}$). Ezen mutánsokat fúziós mátrix segítségével komplementációs csoportokba rendeztük. Ennek alapján a vizsgált kilenc myc^- mutáns törzs mindegyike különböző génben sérültnek bizonyult, mely arra enged következtetni, hogy ezen morfológia számos, egymástól független celluláris folyamatban részt vevő gén hibájából adódhat. Ezzel szemben a vizsgált négy $myc^{- -}$ mutáns törzs közül három azonos, a negyedik különböző génben sérült volt, mely azt mutatja, hogy az ezen morfológiát mutató mutánsok közt kell keresni azokat a géneket, melyek közvetlenül felelősek a hifaképzés hibájáért, a dimorf átalakulás elmaradásáért. A myc^{++} fenotípus is sokféle gén által kódoltnak, azonkívül erősen környezetfüggőnek is bizonyult.

A myc^- és $myc^{- -}$ mutánsok többségénél a vad típustól eltérő **vakuoláris mintázatot** találtunk. Szignifikánsan gyakoribb volt közöttük az olyan törzs, melynek citoplazmája sok apró, egyforma méretű vakuólumot tartalmazott – szemben a vad törzsek néhány nagy, fuzionált vakuólumával – ezen apró vakuólumok meglepte fénymikroszkóppal nem volt kimutatható, csak vakuólumfestéssel megjeleníthető. Mivel az azonos génben sérült három $myc^{- -}$ törzs is egyformán ilyen mintázatot adott, tovább erősítette a feltevést, hogy a $myc^{- -}$ mutáció és a különös vakuoláris mintázat összefügg egymással. A dimorf átalakulás első lépése a sok kicsi vakuólum egy nagy proximális vakuólummá való összeolvadása. Ez marad el ezekben a myc törzsekben, tehát a $myc^{- -}$ fenotípus okozója, vagy annak következtében alakul ki.

A *S. japonicus* **transzformálása** a legkülönbözőbb módszerekkel eredménytelen maradt. Mindezekből arra következtettünk, hogy a más fajból származó ARS (autonóm replikációs szekvencia) -t nem tudja használni, ezért **fajazonos ARS**-t kerestünk a 7-1-es törzs genomjában. Ehhez genomiális génkönyvtárat hoztunk létre, leucinmutáns törzseket transzformáltunk és leu^+ -ra szelektáltunk. A plazmidvesztést mutató törzsekből visszanyert plazmid által tartalmazott genomiális inzertdaradot vizsgáltuk. Restrikciós emésztés és szubklónozások után egy 1,5 kb hosszú fragmentet kaptunk, mely ARS funkciót mutatott *S. japonicus*-ban és kismértékben *S. pombe*-ben is. Mivel az így kapott hipotetikus ARS igen gyengén működött (plazmidvesztési érték kb 3%-os!) feltételezzük, hogy nem valódi ARS-t, hanem e funkciót is bizonyos mértékig ellátni képes fragmentet kaptunk, mely a transzformálás hatásfokát 10x-esére emeli az integratív transzformálás mértékéhez képest. Sajnos azonban a génkönyvtárral történő további transzformálásokkor sem kaptunk olyan telepet, melynek plazmidvesztési értékei ennél sokkal kedvezőbbek lettek volna. A kapott fragmentet megszekvenáltattuk, majd a szekvenciát számítógépes homológiakeresésnek vetettük alá. Aminosavszinten találtunk jelentősebb homológiát a *S. pombe* Cut1 fehérjével. Ennek génje azonban – mint várható is volt – nem képes ARS-funkció ellátására a *S. japonicus*-ban.

Az izolált hipotetikus *S. japonicus* ARS működését leteszteltük egyéb transzformálásban is: az inozitol szintézis génjét, mint domináns markert vittük be *S. japonicus*ba e hipotetikus ARS

mellett. Kaptunk pozitív transzformánsokat, bár ezek néhány mitózis után elpusztultak, ami az idegen fajból származó inozitolgén *S. japonicus*ban történő nem megfelelő működésével magyarázható. További kísérletek jelenleg is folynak még hatékonyabban működő **transzformációs rendszer** kidolgozására.

6. TOVÁBBI TERVEK

- További célunk, hogy a meglévő *S. japonicus* ARS-nél hatékonyabb, aktívabb ARS-funkciót mutató gént izoláljunk. Ehhez még pontosabb *S. japonicus* génkönyvtárat készítünk.
- Így - egy megfelelő transzformációs rendszer birtokában - lehetőségünk nyílna a myc mutánsok transzformálására, ezáltal a dimorfizmusban szereplő gének feltárására.
- Tervezzük ezen kívül, hogy további homológiákat keresünk a *S. japonicus* és a *S. pombe* gének között. Ehhez *S. pombe* replikatív plazmidban (pURN 18) készítünk *S. japonicus* 7-1 genomiális génkönyvtárat és ezzel *S. pombe*-mutánsokat transzformálunk.
- Szeretnénk citológiai szempontból behatóbban tanulmányozni az élesztő és micéliáris megjelenési forma közötti különbségeket, - különös tekintettel a magosztódásban tapasztalt eltérésre - ehhez elektronmikroszkópos felvételek elkészítését tervezzük.
- Hasonlóképpen elektronmikroszkópos felvételekkel alátámasztva kívánjuk tanulmányozni a myc mutánsoknál tapasztalt különleges vakuoláris mintázatot.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Benkő Zsigmondnak a *S. japonicus* genomiális génkönyvtár elkészítésében nyújtott segítségével,
Szilágyi Zsoltnak a Southern Blot technika kivitelezéséért és az e téren szerzett tapasztalatai átadásáért,

Oláh Anita, Lakatosné Ica és Pásztorné Irénke laborasszisztenseknek a rutinszerűen alkalmazott technikák kivitelezésében nyújtott segítségével, a kísérletek megfelelő előkészítéséért.

Sipiczki Mátyásnak a téma vezetéséért, gyakorlati és elméleti tanácsokkal történő támogatásáért, a kutatás fő vonalának megtervezéséért,

Nemes János Gábornak az illusztrációs anyag megszerkesztéséért.

A kutatás anyagi feltételeit az OTKA és FKFP-pályázatokon elnyert ösztöndíjak teremtették meg.

9. REFERENCIÁK

- Adamiková, L., Griac, P., Tomaska, L., Nosek, J. (1998). Development of a transformation system for the multinuclear yeast *Diplodascus (Endomyces) magnusii*. *Yeast* **14**, 805-812.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., Warbrick, E. (1993). Experiments with Fission Yeast. A Laboratory Course Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Allan, V., (1995). Membrane traffic motors. *FEBS Lett* **369**, 101-106.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Amon, A. (2001). Together until separin do us part. *Nat Cell Biol* **3**, 12-14.
- Barbet, N., Muriel, W.J., Carr, A.M. (1992). Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **114**, 59-66.
- Beach, D., Nurse, P. (1981). High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **290**, 140-142.
- Biel, A.K., Brand, J.M., Markovetz, A.J., Bridges, R.J. (1977). Dimorphism in *Ceratocystis minor* var. *barrasii*. *Mycopathologia* **62**, 179-182.
- Bielinsky, A-K., Gerbi, S.A. (2001). Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *J Cell Sci* **114**, 643-651.
- Boeke, J.D., Lacroute, F., Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**, 345-346.
- Cali, B.M., Doyle, T.C., Botstein, D., Fink, G.R. (1998). Multiple functions for actin during filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biology* **9**, 1873-1889.
- Chikashige, Y., Ding, d-Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S. (1994). Telomere led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* **264**, 270-273.
- Cleofe, A.R., Hurtando, A., Rachubinski, R.A. (1999). MHY1 encodes a C2H2-type zinc finger protein that promotes dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **181**, 3051-3047.
- Clyne, R.K., Kelly, J.T. (1995). Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **14**, 6348-6357.
- Clyne, R.K., Kelly, J.T. (1997). Identification of an antonomously replicating sequence (ARS) elements in eukaryotic cells. *Methods in Enzymology* **13**, 221-233.
- Egel, R. (1994). Regulation of meiosis and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In Wessels JGH and Meinhardt F (eds) *The Mycota I. Springer-Verlag: Berlin and Heidelberg*, 251-265.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090.

- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K., Kronstad, J. (1994).** cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* **8**, 2805-2816.
- Gow, N. A. R. (1994).** Growth and guidance of fungal hypha. *Microbiology*, **140**, 3193-3205.
- Gow, N.A. (1997).** Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol* **8**, 43-55.
- Grallert, B., Nurse, P., Patterson, T.E. (1993).** A study of integrative transformation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **238**, 26-32.
- Grallert, A., Miklos, I., Sipiczki, M. (1997).** Division site selection cell separation and formation of anucleate minicells in *Schizosaccharomyces pombe* mutants resistant to cell wall lytic enzymes. *Protoplasma* **198**, 218-229.
- Guevara-Olvera L., Calvo-Mendez C., Ruiz-Herrera J. (1993).** The role of polyamine metabolism of *Yarrowia lipolytica*. *J Gen Microbiol* **139**, 485-493.
- Hadfield, C., Jordan, B.E., Mount, R.C., Pretorius, G.H.J., Burak, E. (1990).** G418 resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **18**, 303-313.
- Hagan, I.M., Hyams, J.S. (1988).** The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **89**, 343-357.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation on transformation on *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557.
- Heyer, W-D., Sipiczki, M., Kohli, J. (1986).** Replicating plasmids in *Schizosaccharomyces pombe*: Improvement of symmetric segregation by a new genetic element. *Mol Cell Biol* **6**, 80-89.
- Hube, B., Hess, D., Baker, C.A., Schaller, M., Schafer, W., Dolan, J.W. (2001).** The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology* **147**, 879-889.
- Hurtado, C.A., Beckerich, J.M., Gaillardin, C., Rachubinski, R.A. (2000).** A rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **182**, 2376-2386.
- Ingavale, S.S., Sharma, K.G., Bachhawat, A.K. (2000)** Construction of fission yeast vectors with novel selection strategy that allows their use in wild-type fission yeasts. *Yeast* **16**, 1345-1350.
- Kaur, S., Mishra, P. (1991).** Dimorphism-associated changes in plasma membrane H⁺-ATPase activity of *Candida albicans*. *Arch Microbiol* **156**, 412-415.
- Kitayama, Y. (2000).** Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus: cell walls, lipids and dimorphism, and action modes of antifungal agents. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **41**, 211-217. Japán nyelvű cikk, angol nyelvű összefoglalóval.
- Keeney, J.B., Boeke, J.D. (1994).** Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**, 849-856.
- Kohli, J. (1987).** Genetic nomenclature and gene list of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **11**, 575-589.
- Kron, S. J., Styles, C. A., Fink, G. R. (1994).** Symmetric cell division in pseudohyphae of yeast

Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell* **5**, 1003-1022.

Kurtzman, C.P. (1989). Estimation of phylogenetic distances among ascomycetous yeasts from partial sequencing of ribosomal RNA. *Yeast* **5**, 351-354.

Lee, G.S., Savage, E.A., Ritzel, R.G., von Borstel, R.C. (1988). The base-alteration spectrum of spontaneous and ultraviolet radiation-induced forward mutations in the *URA3* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **214**, 396-404.

Leija, A., Ruiz-Herrera, J., Mora, J. (1986). Effect of L-amino acids on *Mucor rouxii* dimorphism. *J Bacteriol* **168**, 843-850.

Lindner, P. (1893). *Schizosaccharomyces pombe* n. sp. neuer Gaehrungserreger. *Wochenschr Brau* **10**, 1298-1300.

Madhani, H.D., Fink, G.R. (1998). The riddle of MAP-kinase signalling specificity. *Trends Genet* **14**, 151-155.

Maeda, T., Mochizuki, N., Yamamoto, M. (1990). Adenylyl cyclase is dispensable for vegetative cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 7814-7818.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook J. (1982). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Maundrell, K., Hutchison, A., Shall, S. (1988). Sequence analysis of ARS elements in fission yeast. *EMBO J* **7**, 2203-2209.

Marks, J., Hagan, I.M., Hyams, J.S. (1986). Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl* **5**, 229-241.

May, G.S., McGoldrick, C.A., Holt, C.L., Denison, S.H. (1992). The *bimB3* mutation of *Aspergillus nidulans* uncouples DNA replication from the completion of mitosis. *J Biol Chem* **267**, 15737-15743.

Mayorga, M.E., Gold, S.E. (1998). Characterization and molecular genetic complementation of mutants affecting dimorphism in the fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **24**, 364-376.

McCusker, J.H., Davis, R.W. (1991). The use of proline as a nitrogen source causes hypersensitivity to, and allows more economical use of 5'FOA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 607-608.

McGrew, J.T., Goetsch, L., Byers, B., Baum, P. (1992). Requirement for *ESP1* in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **3**, 1443-1454.

Medoff, J., Jacobson, E., Medoff, G. (1981). Regulation of dimorphism in *Histoplasma capsulatum* by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J Bacteriol* **145**, 1452-1455.

Mitchinson, J.M. (1970). Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Cell Physiol* **4**, 131-165.

Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K., Okayama, H. (1990). High frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by transcomplementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **18**, 6485-6489.

- Okuno, Y., Satoh, H., Sekiguchi, M., Masukata, H. (1999).** Clustered adenine/thyamine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Mol Cell Biol* **19**, 6699-6709.
- Orlowski, M. (1991).** Mucor dimorphism. *Microbiol Rev* **55**, 234-258.
- Paula, C.R., Purchio, A., Gambale, W., Corrae, B. (1987).** Dimorphism of *Scopulariopsis brevicaulis*: morphogenesis of the mould to yeast phase. *Mycopathologia* **100**, 69-74.
- Ramon, A.M., Porta, A., Fonzi, W.A. (1999).** Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *J Bacteriol* **181**, 7524-7530.
- Raudaskoski, M., Mao, W.Z., Yli-Mattila, T. (1994).** Microtubule cytoskeleton in hyphal growth. Response to nocodazole in a sensitive and a tolerant strain of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Eur J Cell Biol* **64**, 131-141.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., Stevens, T.H. (1992).** Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**, 1389-1402.
- Richards, K.L., Anders, K.R., Nogales, E., Schwartz, K., Downing, K.H., Botstein, D (2000).** Structure-function relationships in yeast tubulins. *Mol Biol Cell* **11**, 1887-1903.
- Russel, P., Nurse, P. (1986).** cdc25⁺ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145-153.
- Sambrook, Y., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor, NY*.
- Sánchez-Martínez, C., Pérez-Martín, J. (2001).** Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* **4**, 214-221.
- Sia, R.A., Lengeler, K.B., Heitman, J. (2000).** Diploid strains of the pathogenic basidiomycete *Cryptococcus neoformans* are thermally dimorphic. *Fungal Genet Biol* **29**, 153-163.
- Sipiczki, M., Ferenczi, L. (1977).** Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating type. *Mol Gen Genet* **151**, 77-81.
- Sipiczki, M., Grallert, B., Miklos, I. (1993).** Mycelial and syncytial growth in *Schizosaccharomyces pombe* induced by novel septation mutations. *Journal of Cell Science* **104**, 485-493.
- Sipiczki, M., Heyer, W-D., Kohli, J. (1985).** Preparation and regeneration of protoplasts and spheroplasts for fusion and transformation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Microbiol* **12**, 169-174.
- Sipiczki, M. (1995).** Phylogenesis of fission yeasts. Contradictions surrounding the origin of a century old genus. *Antonie Van Leeuwenhoek* **68**, 119-149.
- Sipiczki, M., Takeo, K., Yamaguchi, M., Yoshida, S., Miklos, I. (1998 a).** Environmentally controlled dimorphic cycle in a fission yeast. *Microbiology* **144**, 1319-1330.
- Sipiczki, M., Takeo, K., Grallert, A. (1998 b).** Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology* **144**, 3475-3485.

- Sipiczki, M. (2000).** Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* **1**, REVIEWS 1011.
- Stewart, E., Hawser, S., Gow, A.R. (1989).** Changes in internal and external pH accompanying growth of *Candida albicans*: studies of non-dimorphic variants. *Arch Microbiology* **151**, 149-153.
- Szabo, R. (1999).** Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiol (Praha)* **44**, 19-24.
- Terasaki, M., Reese, T.S. (1994).** Interactions among endoplasmic reticulum, microtubules, and retrograd movements of the cell surface. *Cell Motyl Cytoskeleton* **29**, 291-300.
- That, T.C., Rossier, C., Barja, F., Turian, G., Roos, U.P. (1988).** Induction of multiple germ tubes in *Neurospora crassa* by antitubulin agents. *Eur J Cell Biol* **46**, 68-79.
- Vissers, S., Thuriaux, P. (1985).** Genetical evidence of carbamoylphosphate compartmentation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Schizosaccharomyces japonicus*. *Cur Genet* **9**, 561-565.
- Wickes, B.L., Mayorga, M.E., Edman, U., Edman, J.C. (1996).** Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-matyng type. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7327-7331.
- Worsham, P.L., Goldman, W.E. (1988).** Selection and characterisation of *ura5* mutants of *Histoplasma capsulatum*. *Mol Gen Genet* **214**, 348-352.
- Yanagida M. (1998).** Fission yeast *cut* mutations revisited: control of anaphase. *Trends Cell Biol* **8**, 144-149.
- Ye, Z-H., Bhattacharjee, J.K. (1988).** Lysine biosynthesis pathway and biochemical blocks of lysine auxotrophs of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **170**, 5968-5970.
- Yukawa M., & Maki, T. (1931).** *Schizosaccharomyces japonicus* nov. spec. *La. Bul. Sci. Facultato Terkultura, Kjusu Imp. Univ., Fukuoka, Japan* **4**, 218-226. (Japán nyelvű cikk angol összefoglalóval.
- Zhu, J., Carlson, D.L., Dubey, D.D., Sharma, K., Huberman, J.A. (1994).** Comparison of the two major ARS elements of the *ura4* replication origin region with other ARS elements in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* **103**, 414-422.

9. FÜGGELÉK

9.1. A témában megjelent főszerzős cikkek

Bozsik, A., Szilágyi, Z., Benko, Z., Sipiczki, M. (2002). *Schizosaccharomyces japonicus*: an alternative fission yeast model. Cloning of a *cut1*-like sequence with ARS activity. *Yeast* (in press)

Impakt faktor:

Bozsik, A., Enczi, K., Sipiczki, M. (2002). Study of the dimorphism of *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*. *Acta Biol. Debrecina*

9.2. Egyéb, társszerzős cikkek

Sipiczki, M., Grallert, Á., Miklós, I., Zilahi, E., Bozsik, A., Szilágyi, Z. (1999). Genetics, physiology and cytology of yeast-mycelial dimorphism in fission yeast. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **46**, 297-302.

Impakt faktor:

Sipiczki, M., Yamaguchi, M., Grallert, A., Takeo, K., Zilahi, E., Bozsik, A. (2000). Role of cell shape in determination of the division plane in *Schizosaccharomyces pombe*: random orientation of septa in spherical cells. *Journal of Bacteriology*, **182**, 1693-1701.

Impact factor:

Sipiczki, M., Yamaguchi, M., Bozsik, A. (2000). The use of morphomutants to investigate septum formation and cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Archives of Microbiology* **174**, 386-392.

Impact factor:

Molnar, M., Parisi, S., Kakiyama, Y., Noyima, H., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., Bozsik, A., Sipiczki, M., Kohli, J. (2001). Characterization of *rec7*, an early meiotic recombination gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **157**, 519-532.

Impact factor: