

EGYETEMI DOKTORI (PH. D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***A SCHIZOSACCHAROMYCES JAPONICUS* VAR.
JAPONICUS DIMORFIZMUSÁNAK
MIKROSZKÓPOS ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATA**

BOZSIK ANIKÓ

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SIPICZKI MÁTYÁS

DEBRECENI EGYETEM, TTK, GENETIKAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI
TANSZÉK

DEBRECEN, 2002

1. Bevezetés

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 hasadóélesztő-gombafaj 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*-re 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.

-- 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, sejtszerkezeti 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. 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 nem patogén gombáknál a dimorfizmus valószínűleg azért jön létre, mert így próbálnak eredményesek maradni mind a folyékony (élesztő) és mind a szilárd (mycelium) szubsztrátumokon.

2.2. A dimorfizmus citológiája

A dimorf átalakulás rendkívül sokrétű, szerteágazó intracelluláris változás következménye. Az egyik ilyen nagymérvű változás a sejtpolaritás terén következik be. Mint a legtöbb dimorf gombafajban, a *S. japonicus*-ban is a sejt polarizációja az élesztő-micéliális átalakulás első lépése: az élesztősejtek, melyek korábban mindkét végükön egyforma mértékben nőttek hirtelen elkezdnek megnyúlni az egyik végükön, miközben a másik sejtpóluson 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 végre (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 örökli a citoplazma legnagyobb részét, míg a tőle proximálisan fekvő nagyobb méretű leánysejtben marad a nagy vakuólum.

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 sejvégre 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 sejtpólus 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: élesztő-micéliális átalakulás során lényeges változások mennek végbe a sejtmembránban (Kitayama, 2000). Az aktin citoszkeleton 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 dimorf átalakulás 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 pszeudomicéliális 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). Magas CO₂-koncentráció is kiválthat hifafonalas formából élesztőalakba való átmenetet *Mucor* specieseknél (Orlowski, 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 dimorf átalakulásra (*Candida albicans*) (Stewart és tsi., 1989). A hőmérséklet 25°C-ról 37 °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 dimorf átalakulás csak szilárd táptalajon játszódik le 17 és 37 °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 ciklázt 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* és a *Schizosaccharomyces* 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* 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. Vegetatív szaporodása kettéhasadás: a hosszúkás, haploid élesztősejtek növekszenek majd a megfelelő méretet elérve középen 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.

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

3. Eredmények és értékelésük

3.1. Citológiai vizsgálatok

Az egysejtű élesztő és a többsejtű hifa alak közötti citológiai hasonlóságok, különbségek felismerése érdekében az élesztő- és hifasejtek mitotikus osztódásának egyes lépéseit vizsgáltuk. A magosztódás főbb lépései azonosnak bizonyultak a két alakban; a hifák esetében ugyanakkor a szétválás után a két új mag ellentétes irányba, a két új sejt végei felé mozogva a mozgás irányába nyúlt meg, mintha a sejt citoszkeletális hálózata „húzná” őket. Ilyesfajta ellentétes irányú kicsúcsosodást élesztőalak esetén nem észleltünk. Ez a torzító hatás tehát valószínűleg a hifasejt intenzív megnyúlásának tulajdonítható.

A fluoreszcens magfestés során 3 db hosszú kromoszomát észleltünk a *S. japonicus*-ban mikroszkóposan. Ezt az eredményt pulzáló erőterű gélelektroforézissel (CHEF) is megerősítettünk. Valóban három sávot kaptunk a *S. japonicus* elektroforetikus kariotipizálásának eredményeként, ami azt bizonyítja, hogy ennek a fajnak 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.

3.2. Auxotróf mutánsok izolálása és csoportosítása

Ahhoz, hogy a *S. japonicus* 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 előállítás 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 törzsből kémiai mutagenézissel, nitrozoguanidin alkalmazásával vagy az UV fény fizikai roncsoló hatásának felhasználásával auxotróf mutánsokat izoláltunk. Összesen 32 db ura^- mutánst, 11 db leu^- , 17 db lys^- , 27 db arg^- , 16 db ade^- mutánst izoláltunk.

A kapott auxotróf mutánsokat csoportokba rendeztük. Mivel e faj diploid állapota rövid, csak a zigótára korlátozódik, ezért a csoportosításhoz a hagyományos komplementációs teszt helyett rekombináción alapuló tesztet alkalmaztunk. Minimál 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. Az azonos génben sérült törzsek egy csoportba kerültek, így a beazonosított csoportok száma a talált gének számát jelöli az egyes auxotrófiák esetén (1. táblázat).

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

1. táblázat: A talált csoportok száma az egyes auxotrófiák esetén

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. Néhány esetben az így kapott Rf érték 0,5-nél (50%-nál) kisebbnek bizonyult, 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* .

3.3. Homológiák keresése más fajok génjeivel

Anyagcsere-köztitermékek felhasználásával beazonosítottuk az egyes auxotróf csoportok hozzávetőleges helyét az egyes bioszintetikus útvonalakban. Mivel ezen bioszintetikus utak meglehetősen konzervatívak az élővilágban ezért a *S. pombe* ismert anabolikus útjait vettük

alapul. Egyes csoportok esetében azonban a pontos funkciót is meglettük, ezáltal meg tudtuk adni ezek homológiát más fajokban. További segítséget jelentett, hogy bizonyos csoportok jellegzetes tulajdonságokat mutattak, másokról pedig korábbi kísérleteink alapján már egyéb információk is álltak rendelkezésünkre. Egy újabb homológiára pedig a molekuláris munkák, a transzformálások során derült fény (lásd: később). Az egyes *S. japonicus* auxotróf csoportokkal más fajokban talált homológiákat a 2. táblázat foglalja össze.

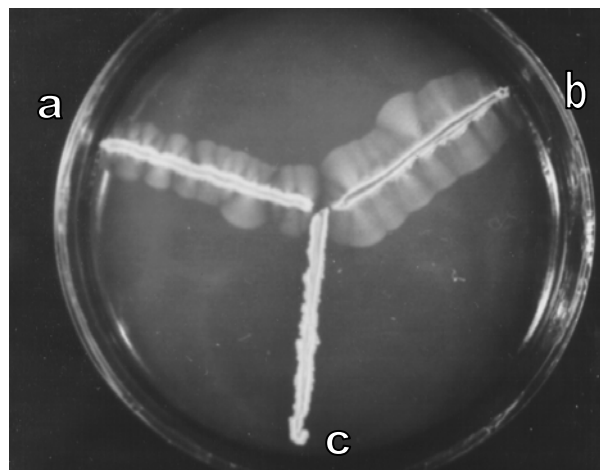
<i>S. japonicus</i> auxotróf csoport	Homológia
ura4⁻	<i>S. pombe ura4</i>
ura3⁻	<i>S. pombe ura5</i>
arg1⁻	<i>S. pombe arg1</i>
leu3⁻	<i>S. pombe leu1</i> <i>S. cerevisiae LEU2</i>

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

3.3. Micéliumképzésben mutáns törzsek izolálása és csoportosítása

A már meglévő auxotróf mutánsaink között olyanokat kerestünk, melyek a vad törzzsel 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⁻⁻*) (1. ábra).



1. ábra

myc = mycelial mutant
a/ vad b/ *myc⁺⁺* c/ *myc⁻⁻*

Valamennyi vizsgált *myc* mutáns estében 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 kapcsoltság az auxotróf jelleg és a *myc* fenotípus között. 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. A kapott eredményekből a *myc* morfológiára nézve csoportokat tudtunk felállítani, ahol a csoportok valószínűsíthetően géneknek felelnek meg. Meglepetésünkre azt kaptuk, hogy az összes vizsgált *myc*⁻ mutánsban különböző gén hibája okoz gyenge hifanövekedést. Ebből arra lehet következtetni, hogy többé-kevésbé gyengült hifanövekedést számos, a legkülönbözőbb típusú intracelluláris folyamat meghibásodása eredményezhet, tehát ilyenkor a micéliumképzési sajátosság csak közvetetten sérül. Ezzel szemben a vizsgált, négy *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*^{- -} lokusz episztatikus a *myc*⁺⁺ lokusz felett. A *myc*⁺⁺ mutáció meglehetősen környezetfüggőnek bizonyult, így azokat behatóbban nem tanulmányoztuk.

3.4. A *myc* mutánsok vakuoláris mintázata

Fluoreszcens vakuolumfestés után UV mikroszkóp alatt vizsgálva a sejteket eltérésre lettünk figyelmesek a vad és a *myc*⁻, ill. *myc*^{- -} (*myc*^{-/-}) mutánsok vakuoláris mintázatát illetően. Míg a vad típusú sejtben apróbb és nagyobb vakuolum egyaránt előfordult, addig a *myc*^{-/-} törzsek sejtjeinek többségére a sok apró vakuolum volt jellemző, néhány nagyobb, fuzionált vakuolum 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 pedig teljesen azonos vakuoláris mintázatot mutatott: citoplazmájukban sok apró, egyenlő méretű vakuolum volt, egyetlen nagyobb, fuzionált vakuolumot sem észleltünk. Tehát a jellegzetes vakuolum-mintázat korrelációt mutatott a micéliáris mutációval. Azonkívül számos esetben a *myc*^{-/-} törzsek feltűnően lekerekedettek is voltak. Mivel a vakuolumok egy nagy, proximális vakuolummá 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.

3.5. Kísérletek megfelelő transzformációs rendszer kidolgozására

Az izolált mutánsokat megpróbáltuk transzformálni a rendelkezésünkre álló leggyakrabban használt *S. pombe* és *S. cerevisiae* vektorokkal, az élesztőknél rutinszerűen alkalmazott bevált transzformációs módszerekkel. Legelőször az izolált uracil és leucin auxotróf mutánsainkat transzformáltuk *S. pombe* és *S. cerevisiae* auxotrófiákat komplementáló géneket tartalmazó plazmidokkal. A transzformálások eredménytelenek voltak annak ellenére, hogy mindhárom, az élesztőknél bevált transzformációs módszert alkalmaztuk. A kudarc oka lehet, hogy nem az auxotróf törzsek hibás génjének megfelelő gént juttattuk be a törzsekbe, 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. A következő lépésben antifungális szerek genéticin (neomycin) illetve hygromycin elleni rezisztenciát hordozó géneket tartalmazó plazmidokkal transzformáltuk a vad típusú *S. japonicus* törzset. Ezek a transzformálások is eredménytelenek voltak. 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, azaz úgy tűnik, sem a *S. pombe*, sem a *S. cerevisiae* ARS-e nem megfelelő a *S. japonicus* számára.

3.6. Fajazonos ARS izolálása *S. japonicus*-ból

Mindezen transzformációs sikertelenségek arra készítették 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. A génkönyvtárral transzformáltuk a *S. japonicus* leucin mutáns törzseit. A transzformálás az egyik leucin mutáns törzs esetében (*leu3⁻*) 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 teszteltük plazmidvesztésre. Számos olyan telepet találtunk (a 16 telepből 15-öt), mely igen erős plazmidvesztést mutatott, tehát feltételezhető volt, hogy a bekerült vektor extrakromoszómálisan szaporodhatott a genomiális inzerttel bekerült ARS funkciójú szekvenciárészlet miatt. Visszanyertük a plazmidot az egyik, plazmidvesztést mutató telepből. EcoRI emésztéssel kivágtuk a genomiális inzertet a visszanyert 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. Szubklónoztunk az 1,5 kb és 2,5 kb nagyságú genomiális fragmentekkel, azaz mindkettőt külön-külön beépítettük pJK148 integratív plazmidba és transzformáltuk velük a *S. japonicus* leu3⁻ törzset. Az 1,5 kb-os fragmentet tartalmazó plazmiddal történő transzformálások során mindig kaptunk transzformáns telepeket, melyek mindegyike mutatta a plazmidvesztést, 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.

Az 1,5 kb nagyságú genomiális fragmentet megszekvenáltattuk. A szekvenciát megvizsgálva találtunk rajta néhány oligonukleotid-részletet, melyek a *S. pombe* egyik típusú ARS-ének konszenzus szekvenciájához (PACS) volt hasonló: PACS: (A/T)PuTT-TATTTA(A/T). 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. 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? A transzformálásokhoz a pCUT1-9 plazmidot használtuk, mely tartalmazza a teljes cut1 gént *S. cerevisiae* LEU2 marker mellett. Transzformáltuk a *S. japonicus* leu3⁻ mutánsát. 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* leu3⁻ mutánsa nem csak a *S. pombe* leu1 génnel komplementálható, hanem annak homológjával, a *S. cerevisiae* LEU2 génnel is.

3.7. 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. Mivel a szekvenciánkból levezetett fehérje konzervatív része a legnagyobb homológiát a *S. pombe* Cut1 proteinnel adta, a *Schizosaccharomyces japonicus* és a *Schizosaccharomyces pombe* közti szoros rokonság egyértelmű. Meglepőbb viszont, hogy ilyen alapon a *Schizosaccharomyces japonicus* az *Aspergillus nidulans*sal közelebbi rokonságban áll, mint a *Saccharomyces cerevisiae*vel.

3.8. Transzformációs hatások

A transzformálások során kapott telepszámokból következtetni tudtunk a transzformációs hatásokra *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 μ g-ra vonatkoztattuk. Az így kapott telepszám-értékeket alapján össze tudtuk hasonlítani a *S. pombe* és *S. japonicus* transzformációs hatásfokát. Ez alapján a *S. pombe leu1-32* mutánsának integratív transzformációja tízszer olyan hatékonynak bizonyult, mint a *S. japonicus leu3⁻* 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 tûhegynyi telep formájában, melyek egy bizonyos méret elérése után nem is növekszenek tovább.

3.9. A hipotetikus *S. japonicus* ARS alkalmazása

A *S. japonicus* genomából 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 *S. japonicus* és szelektív táptalajra szélesztettünk. A

transzformálás eredményes volt, 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.

A hipotetikus *S. japonicus* ARS-t tartalmazó pJK 148 plazmidokkal transzformáltuk a *S. pombe 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 veszteségi 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.

4. 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 *Schizosaccharomyce pombe*-hoz. A **szoros rokonsági kapcsolatot** a két faj között az általunk izolált *S. japonicus*-szekvencia molekuláris analízise is megerősítette.

A genetikai munkákhoz kiváló markerekként 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 megléte 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 pici 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 genomális génkönyvtárat hoztunk létre, leucinmutáns törzseket transzformáltunk és leu⁺-ra szelektáltunk. A plazmidvesztést mutató törzsekből visszanyert plazmid által tartalmazott genomális inzertdarabot 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.

5. Referenciák

- Allan, V., (1995). Membrane traffic motors. *FEBS Lett* **369**, 101-106.
- Biel, A.K., Brand, J.M., Markovetz, A.J., Bridges, R.J. (1977). Dimorphism in *Ceratocystis minor* var. *barrasii*. *Mycopathologia* **62**, 179-182.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Kurtzman, C.P. (1989).** Estimation of phylogenetic distances among ascomycetous yeasts from partial sequencing of ribosomal RNA. *Yeast* **5**, 351-354.
- 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.
- 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.
- 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.
- Medoff, J., Jacobson, E., Medoff, G. (1981).** Regulation of dimorphism in *Histoplasma capsulatum* by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J Bacteriol* **145**, 1452-1455.
- 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.
- 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 Cytoskelet* **29**, 291-300.

6. Melléklet

9.1. A témában megjelent főszerzős cikkek

Bozsik, A., Szilagy, 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)*
Impact factor: 2,83

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., Szilagy, Z. (1999). Genetics, physiology and cytology of yeast-mycelial dimorphism in fission yeast. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **46**, 297-302.

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: 3,51

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: 2,05

Molnar, M., Parisi, S., Kakiyara, 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: 4,7

