

# Tartalomjegyzék

<b><u>1</u></b>	<b><u>BEVEZETÉS</u></b> .....	<b>4</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>2.1</u></b>	<b><u>Kénmetabolizmus a mikroorganizmusoknál</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>2.1.1</u></b>	<b><u>A szerves kénvegyületek felvétele különböző mikroorganizmusoknál</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>2.1.2</u></b>	<b><u>Kéntartalmú szerves vegyületek transzportja</u></b> .....	<b>8</b>
<b><u>2.1.3</u></b>	<b><u>A szulfát sejten belüli aktivációja</u></b> .....	<b>11</b>
<b><u>2.1.4</u></b>	<b><u>Az aktivált szulfát redukciója</u></b> .....	<b>14</b>
<b><u>2.1.5</u></b>	<b><u>A szulfid-ion (S<sup>2-</sup>) beépülése a szerves vegyületekbe</u></b> .....	<b>15</b>
<b><u>2.1.6</u></b>	<b><u>A cisztein bioszintézise</u></b> .....	<b>15</b>
<b><u>2.1.7</u></b>	<b><u>A metionin bioszintézise</u></b> .....	<b>15</b>
<b><u>2.1.8</u></b>	<b><u>A kénmetabolizmus szabályozása</u></b> .....	<b>17</b>
<b><u>2.1.9</u></b>	<b><u>A kénmetabolizmus azonosított génjei <i>Schiz. pombe</i>-nél</u></b> .....	<b>19</b>
<b><u>2.2</u></b>	<b><u>A szelenát-rezisztencia és a szulfát hasznosítás kapcsolata különböző mikroorganizmusoknál</u></b> .....	<b>20</b>
<b><u>2.3</u></b>	<b><u><i>Schiz. pombe</i> klónozó vektorok</u></b> .....	<b>21</b>
<b><u>2.4</u></b>	<b><u>Borok almasavtartalom csökkentésének lehetősége <i>Schiz. pombe</i> élesztőgombával</u></b> .....	<b>21</b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</u></b> .....	<b>24</b>
<b><u>3.1</u></b>	<b><u>Mikroorganizmusok</u></b> .....	<b>24</b>
<b><u>3.2</u></b>	<b><u>Vektorok</u></b> .....	<b>25</b>
<b><u>3.3</u></b>	<b><u>Restriktív enzimek, primerek</u></b> .....	<b>26</b>
<b><u>3.4</u></b>	<b><u>Táptalajok és tápoldatok</u></b> .....	<b>26</b>
<b><u>3.5</u></b>	<b><u>Oldatok</u></b> .....	<b>28</b>
<b><u>3.6</u></b>	<b><u>Módszerek</u></b> .....	<b>30</b>
<b><u>3.6.1</u></b>	<b><u>Szelenát-rezisztens mutánsok indukálása</u></b> .....	<b>30</b>
<b><u>3.6.2</u></b>	<b><u>Protoplaszt fúzió</u></b> .....	<b>30</b>
<b><u>3.6.3</u></b>	<b><u>Mitotikus szegregánsok indukálása benomilos táptalajon</u></b> .....	<b>30</b>
<b><u>3.6.4</u></b>	<b><u><i>Schizosaccharomyces pombe</i> transzformálása lítium-acetátos módszerrel</u></b> .....	<b>31</b>
<b><u>3.6.5</u></b>	<b><u><i>Schizosaccharomyces pombe</i> sejtek transzformálása elektroporációval</u></b> .....	<b>31</b>
<b><u>3.6.6</u></b>	<b><u><i>Saccharomyces cerevisiae</i> transzformálása elektroporációval</u></b> .....	<b>31</b>
<b><u>3.6.7</u></b>	<b><u>Össz-DNS izolálása élesztőgombákból</u></b> .....	<b>32</b>
<b><u>3.6.8</u></b>	<b><u><i>Escherichia coli</i> sejtek transzformálása elektroporációval</u></b> .....	<b>32</b>
<b><u>3.6.9</u></b>	<b><u>Élesztőgomba plazmid felszaporítása <i>Escherichia coli</i>-ban</u></b> .....	<b>32</b>
<b><u>3.6.10</u></b>	<b><u>Plazmid DNS izolálása <i>Escherichia coli</i>-ből</u></b> .....	<b>32</b>
<b><u>3.6.11</u></b>	<b><u>Szelenát-érzékenység vizsgálata</u></b> .....	<b>33</b>
<b><u>3.6.12</u></b>	<b><u>A klónozott DNS szakasz nagyságának meghatározása</u></b> .....	<b>33</b>
<b><u>3.6.13</u></b>	<b><u>A DNS szakasz szekvenálása és analízise</u></b> .....	<b>33</b>

3.6.14	<u>A klónozott gén szubklónozása</u> .....	33
3.6.15	<u>A klónozott gén átvitele <i>S. cerevisiae</i> vektorba</u> .....	33
3.6.16	<u>Kén-hidrogén termelés mérése</u> .....	34
3.6.17	<u>Sejtek rögzítése Na-algináttal</u> .....	34
3.6.18	<u>Almasavtartalom meghatározása enzimes teszttel</u> .....	34
3.6.19	<u>ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának mérése</u> .....	35
<b>4</b>	<b><u>CÉLKITŰZÉSEK</u></b> .....	<b>36</b>
<b>5</b>	<b><u>EREDMÉNYEK</u></b> .....	<b>37</b>
5.1	<u>Uracil-hiányos, transzformálható törzs előállítása hibridizációval</u> ..	37
5.2	<u>Nagyhatékonyságú transzformációs eljárás kidolgozása az S 18-82 <i>ura4<sup>R</sup></i> Se<sup>R</sup>-2 törzsre</u> .....	38
5.3	<u>Az S 18-82 <i>ura4<sup>R</sup></i> Se<sup>R</sup>-2 törzs transzformálása <i>Schiz. pombe</i> genomialis génbankokkal</u> .....	41
5.4	<u>A pozitív telepek szelenát érzékenységeinek vizsgálata</u> .....	41
5.5	<u>A klónozott DNS szakasz nagyságának meghatározása</u> .....	42
5.6	<u>A klónozott genomialis DNS szakasz szekvenálása</u> .....	43
5.7	<u>A klónozott inzert szekvenciájának összehasonlítása adatbázisokban található DNS szekvenciákkal</u> .....	43
5.8	<u>A klónozott DNS szakasz analízise</u> .....	45
5.9	<u>Az <i>sua1</i> gén analízise</u> .....	47
5.10	<u>Az <i>sua1</i> gén szubklónozása</u> .....	50
5.11	<u>Az <i>sua1</i> gén klónozása <i>S. cerevisiae</i> élesztőgombába</u> .....	53
5.12	<u>Az <i>sua1</i> gén egyedüli szelekciós markerként való alkalmazása</u> .....	56
5.13	<u>Térképezett metionin auxotróf törzsek kénforrás hasznosításának vizsgálata</u> .....	56
5.14	<u>Szelenát-érzékeny illetve -rezisztens törzsek ATP-szulfuriláz aktivitásának mérése</u> .....	60
5.15	<u>Szelenát-rezisztens és szelenát-érzékeny törzsek kén-hidrogén termelése</u> .....	60
5.16	<u>Rögzített ATP-szulfuriláz hiányos <i>Schiz. pombe</i> törzsek alkalmazása malo-etanolos fermentációhoz</u> .....	62
5.17	<u>ATP-szulfuriláz hiányos törzsek kén-hidrogén termelésének vizsgálata</u> .....	64
5.18	<u>Bor aromaspektrumának változása maloetanolos fermentáció után</u>	65
<b>6</b>	<b><u>EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE</u></b> .....	<b>66</b>
6.1	<u>A <i>Schiz. pombe</i> ATP-szulfuriláz génjének klónozása</u> .....	66

<u>6.2</u>	<u>Az <i>sua1</i> gén szelekciós markerként való alkalmazhatósága</u>	68
<u>6.3</u>	<u><i>Schiz. pombe</i> szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító törzsek borászatban való felhasználásának lehetősége</u>	69
<u>6.4</u>	<u><i>Schiz. pombe</i> kénmetabolizmusban szerepet játszó fenotípusilag jellemzett génjei</u>	70
<u>7</u>	<u>ÖSSZEFOGLALÓ</u>	72
<u>8</u>	<u>SUMMARY</u>	75
<u>9</u>	<u>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</u>	78
<u>10</u>	<u>FELHASZNÁLT IRODALOM</u>	79
<u>11</u>	<u>MELLÉKLET</u>	88

# 1 BEVEZETÉS

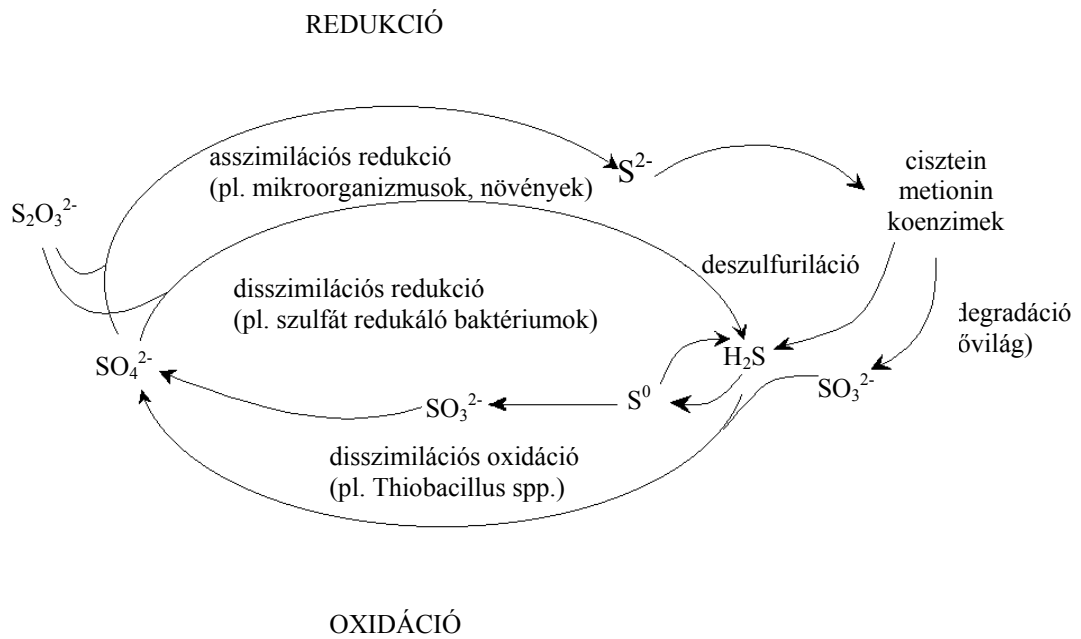
A kén az összes élőlény számára létfontosságú elem, elengedhetetlen része az életnek, a növekedésnek. Az élőlények a környezetükből a ként különböző formában vehetik fel, majd metabolizmusuk során átalakítják, illetve beépítik szerves molekuláikba.

A természetben a kén elemi kénként vagy különböző ionok formájában fordul elő, amelyekben a kénatom lehet oxidált vagy redukált formában. A földkéregben leggyakrabban a legredukáltabb ( $S^{2-}$ ), vagy pedig a legoxidáltabb formájában ( $SO_4^{2-}$ ) fordul elő, de ritkábban előforduló kéntartalmú vegyületek, mint pl. tioszulfátok, ditionátok, politionátok vagy az elemi kén jelenléte sem elhanyagolható. Az óceánokban a kén főleg szulfátok formájában található meg. A vulkanikus mozgások, a biológiai tetemek lebontása és a mesterséges emberi beavatkozások következtében a földből illékony kéntartalmú gázok (főleg  $SO_2$  illetve  $H_2S$ ) kerülnek a levegőbe, amelyek gyorsan szulfáttá oxidálódnak, majd az esővel visszakerülnek a földkéregbe (Kellog és mtsi, 1972).

A mikroorganizmusok kénmetabolizmusa a kén biológiai körforgásának az elejét képezi (1. ábra). Ez a biológiai folyamat a kén oxidált formáinak köszönhetően egy egységet alkot. Egyes mikroorganizmusok a kén oxidált formáit légzésük során terminális elektron-akceptorként használják fel. Különbséget kell tenni a szulfát asszimilációs úton történő redukciója, és a szulfát disszimilációs redukciója között. Az első esetben a szulfát ion a sejt szerves vegyületeinek bioszintézisére "használódik el", a második esetben pedig a szulfát molekula szulfittá vagy szulfiddá redukálódik. A szulfidot vagy szulfidot a sejt leadja, vagyis a kén nem épül be a sejt szerves molekuláiba. A szulfát disszimilációs redukcióját csak néhány baktériumnál sikerült eddig kimutatni (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

A gombák szaporodásához a hasznosítható kénforrás nélkülözhetetlen. Az élesztőgombáknál, mint más szulfát redukáló mikroorganizmusoknál, a szulfát redukciója a szerves kéntartalmú vegyületek, mint pl. a cisztein, metionin vagy az S-adenozilmetionin, bioszintézisében játszik szerepet. Szinte az összes gombafaj képes a szulfátot szerves kénforrásként felhasználni, de a szulfát mellett a szulfit vagy a tioszulfát is szolgálhat szerves kénforrásként. A szulfit folyékony tápközegben három formában van jelen, amelyek aránya a közeg pH-jától függ. Erősen savas pH-nál (<1,77) az  $SO_2$  forma, semleges feletti pH értéknél (>7,2) a szulfit ion ( $SO_3^{2-}$ ) dominál, míg köztes pH-nál e két ion különböző arányban fordul elő a biszulfit ionnal ( $HSO_3^-$ ) együtt. A mikroorganizmusok szulfit hasznosítása pH függő. Ez a szulfitból keletkező kén-dioxid toxikus jellegéből adódik, mely a sejtbe csak alacsony pH értéknél tud bejutni.

Az egyik legintenzívebben kutatott gombafaj, a *Schizosaccharomyces pombe* fiziológiájáról és genetikájáról már sokat tudunk, azonban kénmetabolizmusa kevésbé ismert. Ennek a hasadó élesztőgombának almasavbontó tulajdonsága már régóta ismert, azonban az erjedésztés során termelt kén-hidrogén és egyéb kellemetlen szagú kéntartalmú aromaanyagok miatt borászati alkalmazásának lehetősége már a kísérleti munkák során akadályba ütközött. Ennek a problémának a megoldása érdekében laboratóriumunkban törzsnemesítési kísérleteket folytattunk, melynek eredményeként szulfátot nem hasznosító, szelenát-rezisztens mutánsokat állítottunk elő és jellemeztünk (Bánszky és mtsi, 2003). Jelen doktori értekezés ehhez a kutatómunkához kapcsolódik, a mutánsok analizését tovább folytatva a *Schiz. pombe* kénmetabolizmusának genetikai és fiziológiai tanulmányozását tűzi ki célul.



**1. ábra.** A kén biológiai körforgása (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Kénmetabolizmus a mikroorganizmusoknál

A foszfát ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) után a szulfát (2. ábra) a legnagyobb mennyiségben előforduló szerves anion a sejtekben, amely a legtöbb élőlény számára egyben a legfőbb kénforrást is jelenti. Mint más szerves anion, a szulfát is egy nagyon specifikus membrán transzport segítségével jut be a sejtbe. A szulfát transzportja energia-igényes folyamat és általában több permeázt vesz igénybe. A szulfát redukció egy ősi, szinte valamennyi élőlény esetében azonos enzimes folyamatok segítségével végbemenő katabolikus út, az evolúció során viszonylag keveset változott. A szulfát redukciója szulfittá egy többlépcsős enzimrendszeren keresztül valósul meg (3. ábra): először a szulfát ion az ATP-szulfuriláz enzimnek köszönhetően egy ATP molekulához kötődik, egy bisofoszfát leválása közben. Az így keletkezett 5'-adenilil-szulfát (másként 5'-adenozin-foszfó-szulfát=APS) molekulához az APS-kináz enzim egy foszfocsoportot kapcsol, majd a PAPS-reduktáz az újonnan keletkezett 3'-foszfó-5'-adenilil-szulfát (másként foszfó-adenozin-foszfó-szulfát=PAPS) molekulát szulfittá redukálja. A szulfid a szulfid-reduktáz hatására egy lépésben szulfiddá redukálódik. A szulfid a különböző mikroorganizmusoknál különböző úton épül be a sejt szerves molekuláiba, a feleslegből  $\text{H}_2\text{S}$  keletkezik.

A *S. cerevisiae*-nél a szulfid az O-acetilhomoserinen keresztül épül be a sejt szerves molekuláiba, amelynek során homocisztein keletkezik. A homociszteiből vagy metionin, vagy pedig a cisztationon keresztül cisztein keletkezik. Mivel a ciszteiből az S-adenozilmetioninen keresztül és a metioninból az S-adenozilhomociszteinen keresztül képződhet homocisztein, ezért bármelyik aminosav elegendő egyedüli kénforrásként (lásd 3. ábra) (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

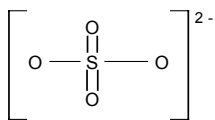
A *Schiz. pombe*-nél a szulfid az O-acetilszerinrel reagál, majd cisztein keletkezik. A cisztein O-acetilhomoserinrel való reakciójából cisztation szabadul fel, ezt követően pedig a cisztationból homociszteinen keresztül metionin keletkezik. Homocisztein ezenkívül két másik reakciónál keletkezik: a szulfid és az O-acetilhomoserin reakciójából, valamint metioninból S-adenozilmetioninen és S-adenozilhomociszteinen keresztül (lásd 4. ábra).

Az *Aspergillus nidulans*-nál és *Neurospora crassa*-nál a szulfid beépülése az aminosavakba nagyon hasonlít a *Schiz. pombe*-nél leírtakkal. Azonban a penészgombáknál a homociszteiből a cisztationon keresztül keletkezik cisztein (lásd 5. ábra), viszont az ehhez szükséges enzimek (cisztation- $\beta$ -szintáz, cisztation- $\gamma$ -liáz) a hasadó élesztőgombánál hiányoznak, így a metioninból homociszteinen és cisztationon keresztül nem keletkezik cisztein (lásd 4. ábra; Brzywczy és Paszewski, 1994).

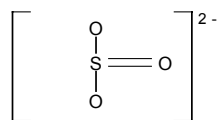
#### 2.1.1 A szerves kénvegyületek felvétele különböző mikroorganizmusoknál

A *S. cerevisiae*-nél a szulfát transzportja két egymástól független úton valósul meg (Breton és Surdin-Kerjan, 1977). Először Smith és mtsi (1995) izoláltak szulfát felvételben sérült *S. cerevisiae* mutánsot, majd a fenotípusért felelős *SUL1* gént is sikerült klónozniuk. A szulfát toxikus analógjaira (szelenát, kromát) rezisztens mutánsokat analizálva sikerült a *SUL1* génen kívül másik két, egymástól független szulfát transzporter gént is azonosítani (*SUL2* illetve *SUL3*). A Sul1p és a Sul2p 62 %-ban azonosak, és nagy hasonlóságot mutatnak a *Neurospora crassa*-nál leírt, *cys14p*-nek elnevezett miceliális szulfát transzporter fehérjével (Ketter és mtsi, 1991). A Sul1p, illetve a Sul2p a sejt membránjába integrálódott fehérjék, amelyek 11 illetve 10 transzmembrán doménnal rendelkeznek. A *sul1* vagy *sul2* deléciós mutánsok szulfát transzport kinetikája azt mutatta, hogy mindkét gén egy magas affinitású szulfát transzporter fehérjét kódol. A *SUL3* gén feltehetően a

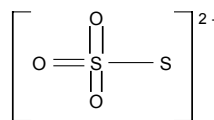
### Szervetlen kénvegyületek



szulfát ( $\text{SO}_4^{2-}$ )



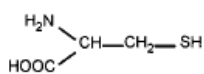
szulfít ( $\text{SO}_3^{2-}$ )



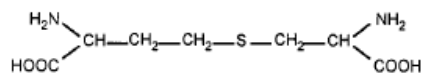
tioszulfát ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ )

### Szerves kénvegyületek

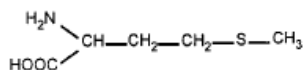
cisztein



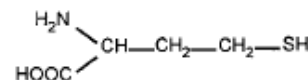
cisztation



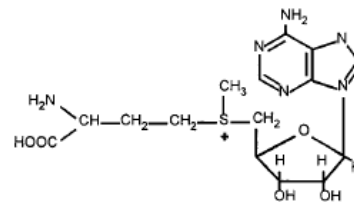
metionin



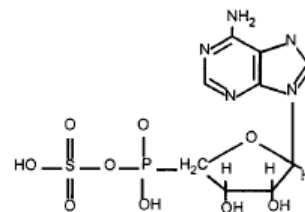
homocisztein



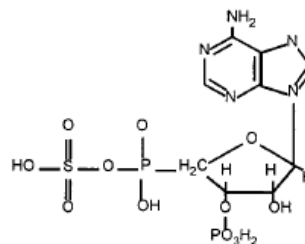
S-adenozilmetionin



5'-adenililszulfát  
vagy  
5'-adenozin-foszfoszulfát (APS)



3'-foszfo-5'-adenililszulfát  
vagy  
3'-foszfo-5'-adenozin-foszfoszulfát (PAPS)



2. *ábra.* A kén különböző vegyületei.

*SUL2* gén átírását szabályozó transzkripciós regulátort kódol. Ennek a regulációnak a mechanizmusa még ismeretlen (Cherest és mtsi, 1997). A *S. cerevisiae*-nél megfigyelték, hogy a szulfát-permeáz és az ATP-szulfuriláz enzim között strukturális kapcsolat van. Ezt a tényt bizonyítja, hogy az ATP-szulfuriláz enzimben sérült mutáns törzseknél a szulfát transzport leáll (Logan és mtsi, 1996). Néhány, nem a szulfát transzportban sérült *S. cerevisiae* mutánsnál is leírták a szulfát transzport hiányát, amely arra vezethető vissza, hogy a sejt feltehetőleg így védekezik a toxikus hatású PAPS és más szerves foszfoszulfátok ellen (Thomas és mtsi, 1992b).

A *S. cerevisiae*-hez hasonlóan a *Neurospora crassa* is két szulfát transzporter génnel rendelkezik. Ezek a permeáz gének genetikailag nagyon különbözőek, de főleg a  $K_m$  értékük nagyon eltérő. A *cys13* gén által kódolt permeáz I a konídiumokban található, míg a *cys14* által kódolt permeáz II a micéliumokban felelős a szulfát transzportért (Marzluf, 1970). A *cys14* volt az első klónozott eukarióta szulfát transzporter gén; 12 membránon áthatoló régióból áll (Ketter és mtsi, 1991). A *S. cerevisiae*-vel ellentétben, a *Neurospora crassa*-nál az ATP-szulfuriláz gén inaktiválása nincs hatással a szulfát felvételre (Marzluf, 1974).

A szulfid transzportjáról megjelent első közlemények azt feltételezték, hogy csak  $SO_2$  formában léphet be a sejtbe egy aktív transzport rendszeren keresztül (Marcis és Markakis, 1974). Egy másik cikkben hasonló következtetésre jutottak azzal a különbséggel, hogy az  $SO_2$  molekula egy egyszerű diffúzióval lép be a sejtbe (Stratford és Rose, 1986). A *Candida utilis*-nél bebizonyították, hogy a szulfáthoz hasonlóan a szulfid és a tioszulfát is hasonló vagy ugyanazt a transzport rendszert használja. Ezt a tényt támasztja alá, hogy a szulfát transzportban sérült *Candida utilis* mutánsok nem voltak képesek felvenni a szulfidot és a tioszulfátot sem (Alonso és mtsi, 1984).

### 2.1.2 Kéntartalmú szerves vegyületek transzportja

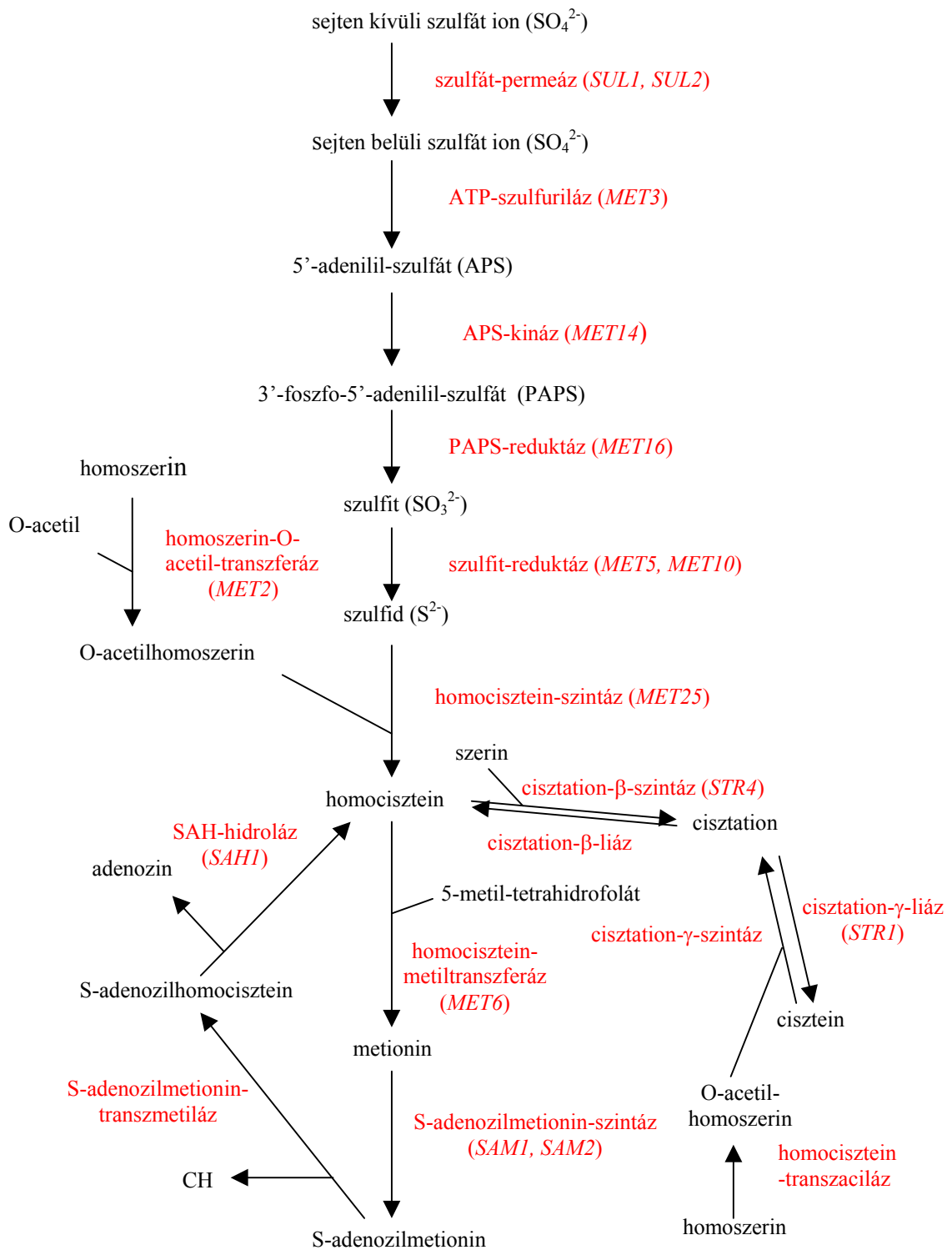
A *S. cerevisiae* az aminosavakat kétféle úton veheti fel: specifikus vagy nem specifikus permeáz segítségével. A Gap1p nem specifikus permeáz felelős a sejt környezetében található L-aminosavak és egyéb vegyületek (pl. ornitin, citrulin stb.) felvételéért (Wiame és mtsi, 1985). Azonban bizonyos nitrogénforrás jelenlétében (pl. ammónium ion) a Gap1p aktivitása megszűnik. Ebben az esetben az aminosavak specifikus permeázok segítségével jutnak át a membránon, amelyek közül néhányat már sikerült leírni. Ezek a specifikus permeázok 12, membránon áthatoló régióval rendelkező, sejtmembránba integrálódott fehérjék. Nagy hasonlóságukból arra lehet következtetni, hogy feltehetően egy géncsaládba tartoznak (André, 1995).

Az egyik kéntartalmú aminosav, a metionin esetében egy nagy affinitású (*MUPI*) és két alacsony affinitású (*MUP2* és *MUP3*) specifikus permeáz kódoló gént sikerült eddig leírni. A *mup1* mutáns törzs metionin auxotrófiát mutat, viszont rezisztens a metionin toxikus analógjával, a metionin-sulfoxiddal szemben. A VII. kromozómán található kis affinitású metionin permeáz kódoló *MUP3* gén nagy hasonlóságot mutat a *MUPI* génnel (Isnard és mtsi, 1996).

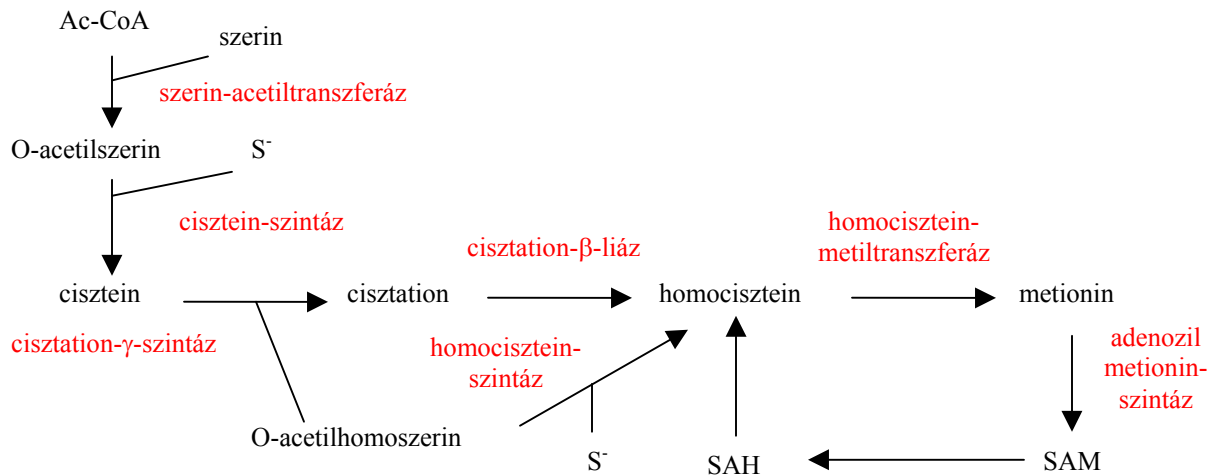
A másik kéntartalmú aminosav, a cisztein transzportja már szintén ismert. Egyelőre a transzportert kódoló gént még nem sikerült izolálni, csak annyi ismeretes, hogy az élesztőgombánál csak egy cisztein-permeáz létezik. A cisztein-permeáz a homocisztein és a metionin jelenléte gátolja (Ono és Naito, 1991).

A *S. cerevisiae* egyike azon mikroorganizmusoknak, amely képes az S-adenozilmetionint (AdoMet) környezetéből felvenni és egyedüli kénforrásként hasznosítani (Uria-Nickelsen és mtsi, 1993). Meglepetésre az AdoMet felvételét erősen gátolja az AdoMet molekulától szerkezetileg különböző leucin aminosav jelenléte (Murphy és Spence, 1972).

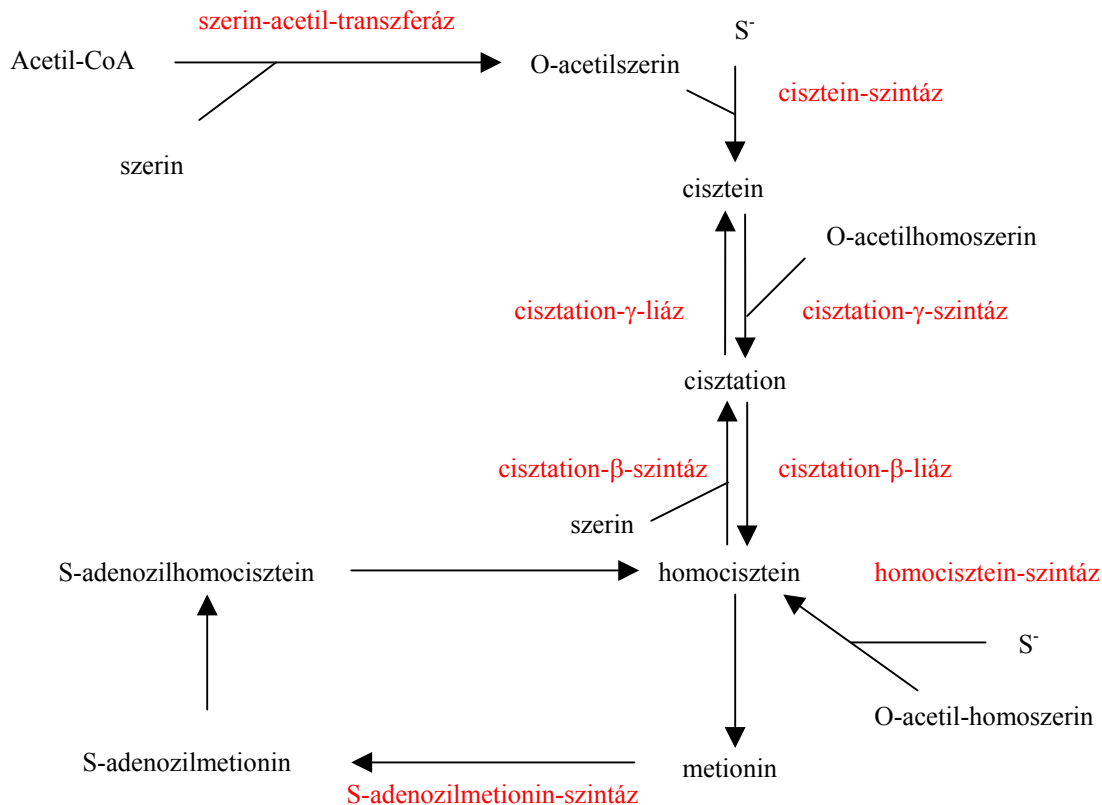




3. ábra. Kénmetabolizmus a *S. cerevisiae* élesztőgombánál. Feketével az egyes vegyületek, pirossal pedig a reakciókat katalizáló enzimek vannak jelölve. Zárójelben az eddig leírt gének találhatóak.



4. ábra. Szulfid ion beépülése a szerves kénvegyületekbe a *Schiz. pombe* gombánál. Feketével az egyes vegyületek, pirossal pedig a reakciókat katalizáló enzimek vannak jelölve. SAH-S-adenozilhomocisztein, SAM-S-adenozilmetionin.



5. ábra. A szulfid (S<sup>2-</sup>) beépülése az aminosavakba az *Aspergillus nidulans*-nál és a *Neurospora crassa*-nál. Feketével az egyes vegyületek, pirossal a reakciókat katalizáló enzimek vannak jelölve.

### 2.1.3 A szulfát sejten belüli aktivációja

A szulfát ion a sejtben először egy enzimrendszeren keresztül aktiválódik, majd szulfiddá redukálódik. A szulfát redukciójára azért van szükség, mert az NADP/NADPH redukáló molokulapárnak az  $E^{\circ}$  értéke nagyobb (-320 mV), mint az  $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$  molokulapáré (-480mV), így a szulfát közvetlen redukciója szulfittá, NADPH oxidációját követően, egy endergonikus reakció lenne (+7,4 kcal/mol). Ezért a szulfátot kénforrásként hasznosító összes élőlénynek a szulfát redukciója előtt szükséges a szulfát adenilációja. Az adenilációt követően a szulfát elektropotenciálja olyan szintre csökken, hogy az NADPH közvetítésével már végbemehet a szulfát redukciója szulfittá (De Meio, 1975; Siegel, 1975).

Az *S. cerevisiae*-nél a szulfát sejten belüli aktiválása két lépésben valósul meg (3. ábra). Első lépésben az ATP molokula adenosil-monofoszfát része megköti a szulfát iont, és ún. adenilil-foszfó-szulfát (APS) keletkezik. A második lépésben az adenilil-foszfó-szulfát ATP segítségével tovább foszforilálódik foszfó-adenilil-foszfó-szulfáttá (PAPS). Az első lépést az ATP-szulfuriláz enzim, a második lépést pedig az APS-kináz enzim katalizálja. Az aktivált szulfát ezután két lépésben tovább redukálódik: a PAPS-reduktáznak köszönhetően az első lépésben szulfittá, majd a szulfít-reduktáz enzimnek köszönhetően szulfiddá. A metabolikus út végén a szulfid-ion beépül a sejt kéntartalmú szerves molokuláiba, többek között a kéntartalmú aminosavakba (cisztein, metionin).

A szulfát aktiválásában szerepet játszó első enzimet, az ATP-szulfurilázt az élesztőgombánál először Robbinsnak és Lipmann-nak (1958) sikerült leírnia. Bebizonyították, hogy a reakció egyensúlya nem kedvez az APS molokula képződésének. Pár évvel később az ATP-szulfuriláz enzimet izolálták és kinetikai tulajdonságát is sikerült megvizsgálni (Hawes és Nicholas, 1973). Az enzimet a katalitikus aktivitása alapján az  $\alpha/\beta$  foszfodiestterázok enzimesaládba sorolták. Az ATP-szulfurilázon kívül ide tartoznak még a pirofoszfátázok és az ATP-difoszfátázok is. Ebbe a csoportba tartozó enzimek képesek az  $\alpha$ - $\beta$  foszfátot különböző nukleotid-trifoszfát (NTP) molokulákról lehasítani, majd a maradék nukleotid-monofoszfát (NMP) molokulát egy másik szubsztráthoz kötni.

Az élesztőgomba ATP-szulfuriláz enzimét a X. kromoszómán található *MET3* gén kódolja (Cherest és mtsi, 1985). A *met3* auxotróf mutánsok nem képesek a szulfátot egyedüli kénforrásként hasznosítani, viszont más szerves kénforrást, mint például a szulfítot, a szulfidot vagy a tioszulfátot jól hasznosítják. A *S. cerevisiae met3* mutánsának segítségével nemcsak az élesztőgombánál sikerült klónozni az ATP-szulfuriláz enzimet kódoló gént, hanem a molokuláris szempontból jól jellemzett *Arabidopsis thaliana* növénynél (Leustek és mtsi, 1994;) valamint a burgonyánál (*Solanum tuberosum*; Klonus és mtsi, 1994) is. Mindkét esetben az adott növény géntankjával transzformálták az élesztőgomba *met3* mutánsát, majd a transzformálás után izolált pozitív klónoknál azonosították az adott növény ATP-szulfuriláz génjét. Ez azt mutatja, hogy az ATP-szulfuriláz enzim az evolúció során kevesett változott, konzervatív enzim.

A *MET3* gén kódolta fehérjének a molokula tömege 58.000 kDa, viszont az előzetes vizsgálatok szerint az aktív ATP-szulfuriláz enzim molokulatömege 100.000 kDa körüli. Ebből arra lehetett következtetni, hogy az aktív enzimet feltehetően egy homodimer molokula alkotja (Hawes és Nicholas, 1973). A későbbi kísérletek viszont azt bizonyították, hogy az ATP-szulfuriláz egy hat alegységből álló, 350-400 kDa méretű homohexamer.

Az ATP-szulfuriláz enzim monomerjei további négy doménra oszthatók. Az első (2-167 aminosav) és a negyedik (394-511 aminosav) domén öt-öt  $\beta$  struktúrából tevődik össze. A molokula aktív régiója és a szubsztrát kötés helye a második doménban (198-327 aminosav) található. A harmadik rövid domén (328-393 aminosav) köti össze a második és a negyedik domént (Ullrich és mtsi, 2001).

Néhány élőlényél megvizsgált ATP-szulfuriláz enzim aktív régiójának aminosav szekvenciáját összehasonlítva több konzervatív szekvenciát találtak. Ide tartozik a <sup>200</sup>HxG/AH, a <sup>190</sup>VxAFQxRNP vagy a szubsztrát kötésében szerepet játszó <sup>288</sup>VGRDHAG rövid szakaszban található "GRD-loop" (Ullrich és mtsi, 2001). Néhány élőlény ATP-szulfuriláz és PAPS-szintáz génjében elvégzett célzott mutagenézisek azt mutatták, hogy az utóbb említett aminosav szakaszban az (VGRDHAG) alanin (A) megváltozásához vezető mutáció az enzim aktivitásának csökkenésével vagy elvesztésével jár (Deyrup és mtsi, 1999; Venkatachalam és mtsi, 1999). Ezzel sikerült bebizonyítani, hogy ezen fehérje szakasz aminosavai fontos szerepet játszanak a nukleozid kötésben, így az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásában. A negyedik, főleg az eukarióta élőlényeknél megtalálható konzervatív szakasz (<sup>356</sup>ISGTxxR) szerepe még nem ismert (Ullrich és mtsi, 2001).

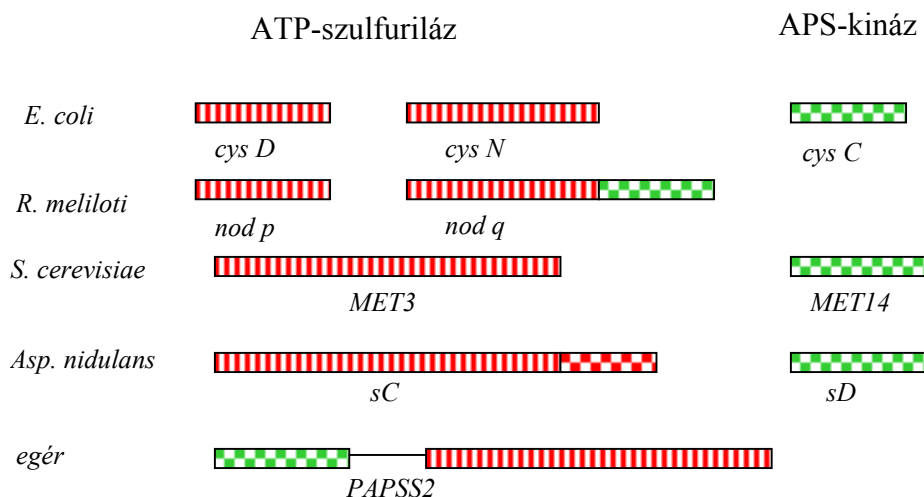
Mao és mtsinak (2002) sikerült a *S. cerevisiae* *MET3* génjének promóterét klónozni a β-galaktozidáz enzimet kódoló gén (*lacZ*) promótereként. A β-galaktozidáz enzim aktivitásának mérésével megállapították, hogy a *MET3* promóter egy viszonylag gyenge promóter, amelyet a metionin represszál.

A *Penicillium chrysogenum* ATP-szulfuriláz enzimje is 6 azonos, 572 aminosavat tartalmazó egységből tevődik össze. Mindegyik egységben található egy szulfhidril csoport (Cys-508) is (Martin és mtsi, 1989). Az N-terminális végen elhelyezkedő 400 aminosavból álló szakasz nagy homológiát mutat a *S. cerevisiae* (66 %), és kisebbet az *Arabidopsis thaliana* (28 %) ATP-szulfuriláz enzimeivel. Akárcsak más penészgombáknál, a C-terminális végen található, 172 aminosavat tartalmazó régió viszont nagyon eltér mind az élesztőgombánál, mind pedig az állat- és növényvilágban leírt ATP-szulfuriláz enzimek C-terminális végeitől (Marzluf, 1997). Ez a C-terminális szakasz nagy homológiát mutat azonban néhány élőlényél leírt APS-kináz enzimmal, ezért úgy tűnik, hogy a penészgombák ATP-szulfuriláz enzimének C-terminális vége az APS-kináz enzimből "származik" (Foster és mtsi, 1994). Ennek az ún. APS-kináz-szerű régióknak köszönhetően a *Penicillium chrysogenum* és más penészgombák ATP-szulfuriláz enzimét az élesztőgombák ATP-szulfuriláz enzimével ellentétben a PAPS molekula allostérikusan gátolja (Martin és mtsi, 1989; Renosto és mtsi, 1990). Azonban sem ez az APS-kináz-szerű régió, sem pedig a teljes ATP-szulfuriláz enzim nem rendelkezik APS-kináz aktivitással (Marzluf, 1997), ezt az enzimet egy különálló gén kódolja (5. ábra).

Az *E. coli* ATP-szulfuriláz enzime 4 alegységből álló heteromerekus enzim, az alegységeket a *cysN* és a *cysD* gének kódolják. Az aktív ATP-szulfuriláz enzim két CysDp és két CysNp monomerből tevődik össze (Leyh és mtsi, 1992). Az enzim GTP hidroláz aktivitása a CysNp alegységben található, és az APS szintézisét a GTP telített koncentrációja stimulálja (Leyh és Suo, 1992). Liu és mtsi-nak (1994) sikerült bebizonyítani, hogy a CysNp által katalizált GTP hidrolízisnél felszabadult kémiai energia az APS molekula szintéziséhez használódik el. Az *E. coli*-nál az APS-kinázt a *cysC* gén kódolja.

A nitrogéntkötő *Rhizobium meliloti* szimbióta baktérium *nodP* és *nodQ* génjei nagy hasonlóságot mutatnak az *E. coli* *cysD*, *cysN* és *cysC* génjeivel (Dénarié és mtsi, 1992). Az aktivált szulfát keletkezését minden bizonnyal mindkét fehérje képes katalizálni. A mért adatok azt a feltevést támasztják alá, hogy a NodQp APS-kináz aktivitással is bír, amely elengedhetetlen az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásához, vagyis a NodQp esetében a két enzim egy multifunkcionális komplexet alkot (Schwedock és mtsi, 1994).

Hasonló komplex található az emlőssejteknél is. A patkány illetve az egér sejtjeiben az ATP-szulfuriláz és az APS-kináz aktivitását egy egyszerű bifunkciós fehérje biztosítja, így a PAPS molekula hatékonyabban tud képződni szulfátból (Lyle és mtsi, 1994). A bifunkcionális enzimet kódoló génből készült cDNS-t már sikerült klónozni. Az aminosav szekvencia analízise azt mutatja, hogy a fehérje egy ATP-szulfuriláz és egy APS-kináz doménből tevődik össze, amelyet egy 37 aminosavból álló szakasz választ el egymástól (Li és mtsi, 1995).



**6. ábra.** ATP-szulfuriláz és APS-kináz enzimek hasonlósága különböző baktériumoknál, gombáknál és magasabbrendű eukariótáknál. Pirossal az ATP-szulfuriláz, zölddel pedig az APS-kináz van jelölve.

Az 6. ábra szemlélteti az ATP-szulfuriláz és APS-kináz enzimeket kódoló gének szerkezeti különbségeit a baktériumoktól egészen az eukarióta szervezetekig. Az *E. coli*-nál az ATP-szulfuriláz enzimet két gén kódolja, míg egy külön enzim az APS-kináz enzimet. A *Rhizobium*-nál már csak két gén található: a másik ATP-szulfurilázot kódoló gén egyben az APS-kináz enzimet is kódolja. Az élesztőgombánál külön gének kódolják mind az ATP-szulfuriláz, mind pedig az APS-kináz. Az *Asp. nidulans*-nál az ATP-szulfuriláz C-terminális végén egy APS-kináz domén található. Az emlősöknél egy ATP-szulfuriláz és egy APS-kináz aktivitással is bíró ún. bifunkcionális fehérjét sikerült kimutatni.

Bár a *S. cerevisiae*-nél a szulfát aktiválásában résztvevő két enzim az emlőssejtekre jellemző komplexet nem alakít ki, azonban fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatható a szulfát transzporterek, a szulfát aktiváló enzimek és a PAPS-reduktáz enzim között. Megfigyelték, hogy az ATP-szulfuriláz (*MET3*), az APS-kináz (*MET14*) vagy a PAPS-reduktáz (*MET16*) kódoló génekben sérült mutánsok szulfát transzportja is hiányzik (Breton és Surdin-Kerjan, 1977; Thomas és mtsi, 1990). Ez azt bizonyítja, hogy az előbb említett enzimek hatással vannak a szulfát felvételére. Ezt a hatást tovább erősítette az a tény is, hogy az *Arabidopsis thaliana* kloroplasztiszanak ATP-szulfuriláz enzimét kódoló *ASA1* génnek az élesztőgomba *met3* mutáns törzsébe való klónozása után az élesztősejt visszanyerte ATP-szulfuriláz aktivitását, de a szulfátot utána sem volt képes környezetéből felvenni. Ez azzal magyarázható, hogy a növény aktív ATP-szulfuriláz enzime nem képes az élesztőgomba szulfát transzporterjével egy funkcionális multikomplex kialakítására (Logan és mtsi, 1996).

A *S. cerevisiae*-nél a szulfát aktiválása során a sejten belül keletkezett adenilil-foszfoszulfát (APS) vegyülethez hőtoleranciát is kapcsolódik. Jakubowski és Goldman (1993) megfigyelték, hogy metionin jelenlétében az élesztősejtek életképessége jelentősen csökkent, amikor a hőmérsékletet 30 °C-ról 45 °C-ra emelték. Viszont metionin hiányos közegben tenyésztett

ugyanazon élesztőtörzs a hőmérséklet emelkedést jól viselte. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a sejten belüli APS molekulának magas hőmérsékleten egy bizonyos "sejtvédő" szerepe is van.

A szulfát aktiválásának második lépésében az APS molekula magnézium ion ( $Mg^{2+}$ ) és ATP jelenlétében tovább foszforilálódik PAPS molekulává. Ezt a lépést az APS-kináz enzim katalizálja, amely aktív állapotban egy homodimer (Schriek és Schwenn, 1986). A *S. cerevisiae* APS-kináz monomerjét a *MET14* gén kódolja (Massetot és Surdin-Kerjan, 1977). Ezt a gént először Fitzgerald-Hayes és mtsi-nak (1982) sikerült klónozni, Korch és mtsi-nak (1991) pedig megszekvenálni. Az élesztőgomba Met14p aminosav szekvenciája nagy hasonlóságot mutat más mikroorganizmusoknál leírt APS-kinázok szekvenciájával.

Az *Aspergillus nidulans*-nál az *sD* gén kódolja az APS foszforilálását katalizáló APS-kináz enzimet. Ez a gén egy 59 bp hosszú intront tartalmaz, mely 8 bázispárral a kezdő ATG kodon után helyezkedik el. Az enzim 206 aminosavból áll és nagy homológiát mutat a *P. chrysogenum*-nál (82 %) és a *S. cerevisiae*-nél (75 %) leírt APS-kináz enzimekkel (Marzluf, 1997).

#### 2.1.4 Az aktivált szulfát redukciója

A szulfát ion aktiválása után az első redukciós lépést, amely során a PAPS molekula foszfo-adenil-foszfátra és szulfitra bomlik, a PAPS-reduktáz enzim katalizálja. Először Wilson és mtsi-nak (1961) sikerült frakcionálniuk a NADPH-PAPS reduktáz komplexet három önálló részre: két fehérjerészre és egy komplexre. Megállapították, hogy a PAPS-reduktáz két egységből álló homodimer, melyhez co-subsztrátként egy redukált tioredoxin kapcsolódik. A PAPS-reduktáz enzimet a *S. cerevisiae*-nél a *MET16* gén kódolja (Berendt és mtsi, 1995; Masselot és Surdin-Kerjan, 1977; Thomas és mtsi, 1990). A Met16p nagy hasonlóságot mutat az *E. coli* baktériumnál (*cysH*) és más gombánál leírt PAPS-reduktáz enzimekkel (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997). Az eddig leírt összes PAPS-reduktáz enzim tartalmaz egy ún. tioredoxin domént, amely feltehetően az enzim katabolikus regulációjában játszik szerepet, ugyanis az APS redukció tioredoxin hiányában is megfigyelhető (Gutierrez-Marcos és mtsi, 1996).

A növényeknél az APS molekula redukciója szulfittá közvetlenül is megvalósulhat, PAPS keletkezése nélkül. Azonban az a tény, hogy a PAPS-on keresztüli szulfát asszimilációs út is megtalálható a növényeknél, azt a spenótnál leírt tioredoxin függő PAPS-reduktáz enzim bizonyítja (Schwenn, 1994).

A szulfít redukciója szulfiddá három NADPH molekula oxidálásával történik. Ezt a lépést a szulfít-reduktáz enzim katalizálja, amelyet mind a baktériumoknál mind pedig az élesztőgombánál már sikerült azonosítani (Ostrowski és mtsi, 1989; Yoshimoto és Sato, 1968). A *S. cerevisiae* szulfít-reduktáz enzime négy alegységből tevődik össze: két  $\alpha$  és két  $\beta$  alegységből. Az 1035 aminosavból álló  $\alpha$  alegységet a *MET10* gén kódolja (Kobayashi és Yoshimoto, 1982a). Ennek az alegységnek a C-terminális vége hasonlóságot mutat az *E. coli* szulfít-reduktáz enzim CysJp alegységével. Az élesztőgomba  $\beta$  alegységét a X. kromoszómára térképezett *MET5* gén kódolja, amely szintén nagy hasonlóságot mutat az *E. coli*-nál leírt szulfít-reduktáz enzim  $\beta$  alegységével (Kobayashi és Yoshimoto, 1982b). Az élesztőgomba *MET5* génben sérült mutánsa hasonló fenotípust mutat, mint a *met10* mutáns (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

#### 2.1.5 A szulfid-ion ( $S^{2-}$ ) beépülése a szerves vegyületekbe

A szulfid ion ( $S^{2-}$ ) beépülése a szénláncba az első lépés a kéntartalmú aminosavak (cisztein ill. metionin) szintézisében.

A *S. cerevisiae*-nél e lépés során a szulfid ion egy O-acetilhomoszerin molekulával lép reakcióba (3. ábra), és egy molekula víz kilépése mellett homocisztein keletkezik. Ez az egyedüli

reakció, melynek során a kénatom beépülhet a szénláncba. Ezt a reakciót a *MET25* gén által kódol homocisztein-szintáz enzim katalizálja. A *MET25* megegyezik a *MET15* génnel, melyet Singh és Sherman (1974) írtak le, mikoris metil-fém rezisztens mutánsokat kerestek. A metil-fém rezisztens *met25* mutáns törzsnél a homocisztein-szintáz hiánya miatt a sejten belül hidrogén-szulfid halmozódik fel, mely a metil-fém molekulával reakcióba lép, ezáltal csökkenti toxikus hatását (Thomas és mtsi 1992b). A *Met25p* nagy hasonlóságot mutat az *E. coli* baktériumnál talált cisztation- $\gamma$ -szintáz (*metB*), cisztation- $\beta$ -liáz (*metC*) és a *S. cerevisiae*-nél, illetve a patkánynál leírt cisztation- $\gamma$ -liáz enzimekkel. Ezért feltehetőleg az előbb említett összes enzim egy fehérje csoportba tartozik, melyek a piridoxal foszfát enzimekből származnak (Cherest és mtsi, 1973).

### 2.1.6 A cisztein bioszintézise

Az enterobaktériumoknál az egyedüli transzszulfurilációs út a cisztein homociszteinné való konverziója. Ezzel ellentétben az emlősök a homociszteint ciszteinné tudják alakítani, de ciszteinből nem képesek homociszteint szintetizálni. Az élesztőgombánál két különböző enzim rendszernek köszönhetően, mindkét előbb említett út működik (lásd 3. ábra).

A *S. cerevisiae*-nél a cisztein bioszintézise két ciszteinre auxotróf mutáns törzs (*str1* és *str4*) tesztelésénél került a figyelem középpontjába (Cherest és Surdin-Kerjan, 1992). Ezek a törzsek sem metionin, sem pedig homocisztein jelentében nem mutattak növekedést. Az *str1* mutánsnál a cisztation- $\gamma$ -liáz, míg az *str4* mutáns törzsnél a cisztation- $\beta$ -szintáz enzim aktivitása hiányzott. Ez azt bizonyította, hogy az élesztőgombánál a homocisztein ciszteinné való átalakulása az egyedüli metabolikus út, mely cisztein képzéséhez vezet (Barton és mtsi, 1993; Cherest és mtsi, 1993). A cisztein képzésénél a cisztation- $\beta$ -szintáz enzim katalizálja az első lépést, mely során egy  $\beta$  addícióra kerül sor (Ono és mtsi, 1994), a cisztation- $\gamma$ -liáz pedig a második lépést (Yamagata és mtsi, 1993). A két mutáns törzs (*str1*, *str4*) kénforrásként glutationt is képes hasznosítani, ugyanis a glutation ciszteinre hidrolizál, mely mint szerves kénforrás áll a sejt rendelkezésére (Cherest és Surdin-Kerjan, 1992; Cherest és mtsi, 1993). Az emberi cisztation- $\beta$ -szintáz kódoló gén képes komplementálni a *str4* cisztein auxotróf mutánst (Kruger és Cox, 1994). A *S. cerevisiae*-nél később izolált *CYS3* illetve *CYS4* gének megegyeznek az *STR1* illetve az *STR4* génekkel (Ono és mtsi, 1992; Ono és mtsi, 1988).

Az *Asp. nidulans*-nál a cisztein szintézisének fő lépése a cisztein-szintáz enzim által katalizált szulfid reakciója O-acetilszerinrel (5. ábra). Azonban az előbb bemutatott úton is keletkezhet cisztein: az O-acetilhomoserin szulfurilációja során homocisztein keletkezik, amelyből cisztationon keresztül cisztein keletkezhet. Ha ez az alternatív út blokkolva van, a cisztein-szintáz génben sérült *cysB* mutánsok csak cisztein jelenlétében képesek a növekedésre. A *cysB* mutánsok sejt kivonatának cisztein-szintáz aktivitása megegyezett a vad típuséval. Ez azzal magyarázható, hogy a mitokondriumban és a citoplazmában cisztein-szintáz izoenzimek találhatóak (Marzluf, 1997). A *cysB* gén által kódolt enzim N-terminális végén egy ún. „tranzit“ szakasz található, ami azt bizonyítja, hogy ez az enzim a mitokondriumban fejt ki katalizáló hatását (Sienko és mtsi, 1998).

### 2.1.7 A metionin bioszintézise

A *S. cerevisiae*-nél a metionin egy ún. „egyszerű-szén metabolizmus” út során keletkezik (7. ábra). Közvetlenül a metionin keletkezése előtt egy metil gyök kötődik egy homocisztein molekulához (Jones és Fink, 1982). Az egyszerű-szén metabolizmusban sérült mutánsok metionin auxotrófok, de egyedüli kénforrásként nem tudják hasznosítani sem a ciszteint, sem pedig a homociszteint. Ezek a mutánsok a *MET7* vagy a *MET13* génekben sérültek.

Ebben a metabolikus útban csak egy lépés specifikus a metionin szintézisre: az 5,10-metilén-tetrahidrofolát redukciója 5-metil-tetrahidrofoláttá. Ezt a lépést a metilén-tetrahidrofolát-

reduktáz enzim katalizálja. A *S. cerevisiae* genomja két olyan ORF-et tartalmaz (*YCL125w*, *YPL023c*), mely nagy hasonlóságot mutat az emlősöknél leírt metilén-tetrahidrofolát-reduktáz enzimmal. Az élesztőgombánál leírt *MET13* gént a *YCL125w* régióba térképezték. A *YCL125w* ORF mutánsa, a *met13* mutánsához hasonlóan metionin auxotróf (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997), míg az *YPL023c* ORF mutáns törzs prototróf. Ebből adódóan a *YCL125w* ORF nagy valószínűséggel megegyezik a *MET13* génnel, mely a VII. kromoszómán található (Mortimer és mtsi, 1992).

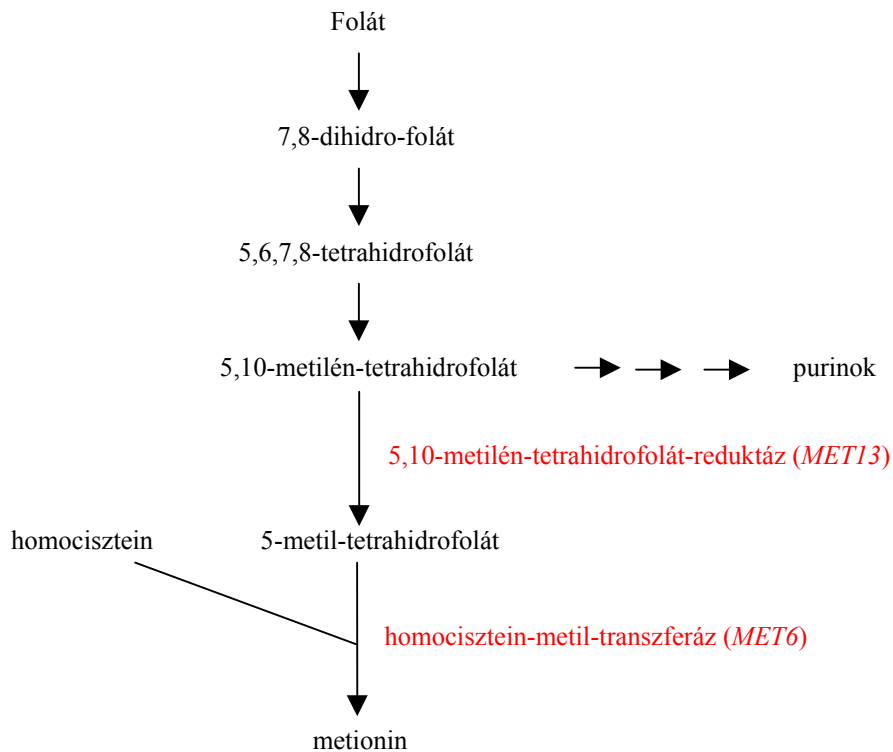
A *met7* mutánst először adenin és metionin auxotrófiával jellemezték, azonban a további kísérletek bebizonyították, hogy csak metionin auxotrófiát hordoz (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997). Az élesztőgomba *MET7* génje nagy hasonlóságot mutat a XV. kromoszómára betérképezett *YOR241w* ORF-el (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997) és feltehetőleg a tetrahydrofoil-glutamát-szintáz enzimet kódolja. Kimutatták, hogy *in vivo* az összes egyszerű-szén metabolizmus útban részt vevő enzim képes a tetrahydropteroil koenzim monoglutamát részét hasznosítani. Ez az enzim katalizálja a tetrahydropteroil-glutamát molekula glutamát láncának növekedését. Emlőssejteknel kimutatták, hogy a poliglutamát molekulát nem szintetizáló sejt az egyszerű-szén metabolizmus út végtermékeire (metionin, timin, adenin) auxotróf (Schirch és Strong, 1989). Mivel a *met7* mutáns csak metioninre mutatott auxotrófiát, ezért az élesztőgombánál a katalizáló szerep ellátásához csak a metionin-szintáz enzimnek van szüksége a tetrahydropteroil koenzim poliglutamát részére.



Az "egyszerű-szén metabolizmus" során keletkezett 5-metil-tetrahydrofolát és a homocisztein reakcióját, melynek során metionin keletkezik, a homocisztein-metil-transzferáz enzim katalizálja. Más élőlényeknél leírt homocisztein-metil-transzferáz enzimekkel ellentétben a *S. cerevisiae* homocisztein-metil-transzferáz enzime  $B_{12}$  vitamin jelenlététől független (Burton és mtsi, 1969). Ez megmagyarázza azt a tényt, mely szerint az élesztőgomba nem képes megfelelő mennyiségű  $B_{12}$  vitamin termelésére, valamint hogy az élesztő tenyésztésére használható tápoldatok sem tartalmaznak  $B_{12}$  vitamint (Flavin, 1975). Az élesztőgomba homocisztein-metil-transzferáz enzimét a *MET6* gén kódolja (Csaikl és Csaikl, 1986; Mountain és mtsi, 1991). A *met6* mutáns egyedüli kénforrásként AdoMet-et tartalmazó táptalajon is nő, ami azt bizonyítja, hogy az élesztő az AdoMetből homocisztein metilációja nélkül is képes metionint szintetizálni. Mivel az AdoMet-szintáz enzim által katalizált reakció irreverzibilis, ezért a *met6* mutáns AdoMet hasznosítása egy másik úton történik.

Az *E. coli*-nál két homocisztein-metil-transzferáz aktivitással bíró enzim található. A MetHp fehérje egy  $B_{12}$  vitamin függő, míg a MetEp fehérje  $B_{12}$  vitamintól független (Old és mtsi, 1991). Az emlősöknél a homocisztein-metil-transzferáz aktivitása kobaltamin függő (Chen és mtsi, 1995), viszont a *Catharanthus roseus* növény *E. coli*-ban klónozott homocisztein-metil-transzferáz enzim aktivitásához nincs szükség  $B_{12}$  vitaminra (Eichel és mtsi, 1995).





7. ábra. A *S. cerevisiae*-nél leírt ún. egyszerű-szén metabolizmus út.

### 2.1.8 A kénmetabolizmus szabályozása

Régóta ismert tény, hogy az élesztőgombáknál a szerves kénforrások jelenlétében történő aminosav bioszintézisre különböző vegyületek negatívan hatnak. Ilyen vegyületek pl. a metionin vagy az AdoMet, melyek a szulfát asszimilációhoz szükséges enzimek szintézisét represszálják (Cherest és mtsi, 1969).

A *S. cerevisiae*-nél az "általános" aminosav bioszintézis utat a Gcn4p transzkripciós regulátor szabályozza. A Gcn4p fehérje azon gének expresszióját szabályozza, melyeknél a promóter régióban az ATG(C/G)TCAT szekvencia megtalálható (Hinnebush, 1992). Azonban a legtöbb MET gén promóter régiójából ez a szekvencia hiányzik. A *MET25* gén promóter régiójának elemzésénél két, a transzkripcióban részt vevő szekvenciát sikerült találni: 1., CACGTG palindróm szekvencia, amely a sejten belüli AdoMet koncentrációjának csökkenésekor a *MET* gének derepressziójáért felelős; 2., AAANTGTG, amely sejten belüli magas AdoMet koncentrációnál a *MET25* gén teljes represszióját idézte elő.

A TCACGTG szekvenciára kötődik a *CBF1* gén által kódolt "helix-loop-helix" (bHLH) domént tartalmazó fehérje is (Mellor és mtsi, 1990). A Cbf1p fehérjével elvégzett további kísérletek azt mutatták, hogy a fehérje a kénmetabolizmus regulációján kívül a kromoszómák szegregációját is szabályozza (Baker és Masison, 1990; Cai és Davis, 1990). A *cbf1* mutáns törzsnél a *MET16* gén transzkripciója erősen lecsökkent, valamint a szulfát-permeáz aktivitása is hiányzott (Thomas és mtsi, 1992a). A *MET16* gén mellett a *MET10* és a *MET14* gének expressziója is nagyban függ a

Cbf1p fehérje jelenlététől. Ezzel ellentétben a *MET3* illetve a *MET25* transzkripciója a *cbf1* mutánsban a vad típussal összehasonlítva csak a felére csökkent (Kuras és Thomas, 1995). Ebből arra lehetett következtetni, hogy a *CBF1* gén mellett más transzkripciós regulátorok is szerepet játszanak a MET gének expressziójának szabályozásában.

A kénmetabolizmusban résztvevő gének transzkripcióját a *CBF1* gén mellett a *MET4* gén is jelentősen befolyásolja. A *met4* mutánsban a szulfát transzporton kívül a *MET2*, *MET3*, *MET5*, *MET14*, *MET16*, *MET10* és a *MET25* gének transzkripciója is hiányzik (Thomas és mtsi, 1990, Thomas és mtsi, 1992a). A *MET4* locusban sérült sejt metionin auxotróf és nem képes egyedüli kénforrásként a ciszteint illetve a szerves kénforrásokat hasznosítani (Thomas és mtsi, 1992b). A Met4p leucin-zipper doménnal kötődik a DNS molekulához (Landschulz és mtsi, 1988). Azt a feltevést, hogy a transzkripciós aktivátornak is lehet (van) transzkripciós szabályozója az a tény támasztja alá, hogy a *MET4* gén transzkripcióját negatívan szabályozza a Met30p fehérje. A Met30p magas AdoMet koncentrációnál gátolja a Met4p transzkripciós aktivátor hatását. A *met30* auxotróf mutáns represszív növekedési körülmények között sárga telepeket képez (Thomas és mtsi, 1995), amely feltehetőleg a sejten belüli kéntartalmú vegyületek felhalmozódásával magyarázható.

A *MET28* gén volt a harmadik leírt gén a *S. cerevisiae*-nél, amely a *MET* gének regulációjában szerepet játszik. Az élesztőtömba *met28* mutáns törzse szerves kénforrásokra auxotróf és a vad típusú törzssel összehasonlítva szelenáttal szemben rezisztens (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997). A másik két transzkripciós regulátor fehérjéhez hasonlóan (Cbf1p és Met4p) a Met28p is leucin-zipper doménnal rendelkezik (Kuras és mtsi, 1996). Northern Blot analízissel sikerült bizonyítani, hogy a vad típushoz képest a *met28* mutáns törzsből a *MET3*, *MET10*, *MET14* és a *MET16* gének transzkripciója csökkent, azonban a *MET25* gén transzkripciójának mértéke nem változott (Kuras és mtsi, 1996). A Met28p alacsony sejten belüli AdoMet koncentrációnál pozitív regulátorként hat a MET gének transzkripciójára.

A fent említett adatokból következik, hogy a *S. cerevisiae*-nél legalább három, a *MET* gének transzkripcióját szabályozó pozitív regulátor fehérje létezik. Azonban a *MET* gének promóter régiójában csak egy pozitív *cisz* szabályozó szekvenciát találtak (CACGTG), amiből arra lehet következtetni, hogy a három fehérje egy komplexként kötődik az előbb említett szekvenciához. Ezt a hipotézist két-hibrid kísérlettel sikerült is bizonyítani. A Cbf1p-Met4p-Met28p komplexen belül a Met4p és a Met28p saját leucin-zipper doménjukkal kötődnek egymáshoz, illetve hasonló kapcsolat van a Cbf1p bHLH és a Met4p leucin-zipper doménja között is. A Met28p és a Cbf1p között semmilyen kölcsönhatás sem volt megfigyelhető (Kuras és mtsi, 1996).

A *Neurospora crassa*-nál legalább három regulátor gént ismerünk (*SCON1*, *SCON2* és *CYS3*), amelyek közül a *Scon1p* és *Scon2p* fehérjék a *CYS3* gén negatív regulátorai (Marzluf és Metzberg, 1968; Paietta, 1990). A *Cys3p* fehérje a *S. cerevisiae*-nél leírt Met4p és Met28p fehérjékhez hasonlóan leucin-zipper doménnal kötődik a DNS-hez. A *cys3* mutáns törzsből sem a szulfát-permeázst, sem pedig az ATP-szulfuriláz kódoló gének nem íródnak át. Mutagézissel sikerült megállapítani, hogy a *Cys3p* a kénmetabolizmus génjeinek promóter régiójában lévő 10 bp szekvenciához (ATGRYRYCAT) kötődik (Li és Marzluf, 1996).

### 2.1.9 A kénmetabolizmus azonosított génjei *Schiz. pombe*-nél

Bár a *Schiz. pombe* fiziológiailag és genetikailag a legismertebb élesztőtömbák egyike, kénmetabolizmusa mégis kevéssé felderített. A többi élőlényénél megismert gének közül, mindössze négyet sikerült eddig genetikailag és funkcionálisan is leírni. E téren bizonyos áttörést jelentett a Pombe Genom Project, amelynek során sikerült a hasadó élesztőtömba mindhárom kromoszómájának a teljes szekvenciáját megismerni (Wood és mtsi, 2002). A megszekvenált kromoszómákon talált ORF-eket összehasonlították a DNS adatbankokban talált más élőlényeknél leírt génekkel. Így sikerült homológia alapján megtalálni és feltételelesen azonosítani a hasadó

élesztőgomba kénmetabolizmusában szerepet játszó gének nagyrészét. Az I. kromoszómára többek között a homocisztein-metil-transzferázt, a metiltetrahydrofolát-reduktázt, a PAPS-reduktázt; a II. kromoszómára a szulfát-transzportert, a homoszerin-O-acetiltranszferázt, a homocisztein-szintázt; a III. kromoszómára pedig a szulfít-reduktázt kódoló géneket sikerült azonosítani. Meg kell azonban jegyezni, hogy csak szekvencia azonosság alapján feltételezik az így megtalált gének funkcióját, teljes körű szerepükről, szabályozottságukról és a működésük kiesésével járó fenotípusos változásról azonban nincsenek ismeretek.

Először Kohli és mtsi (1977) izolálaltak *Schiz. pombe* törzsekből metionin hiányos mutánsokat, amelyeket *met1*-től *met5*-ig jelölt komplementációs csoportba sorolták. Az egyes mutánsoknál a gének térképezését genetikai módszerekkel (tetrád analízis, indukált haplodizáció) sikerült megállapítaniuk: a *met1*, *met2* és *met5* mutánsoknál a mutáns allélok az I. kromoszómára, míg a *met3* és a *met4* mutánsoknál a II. kromoszómára térképezték. A *met1*-*met5* mutánsok (komplementációs csoportok) elnevezése azonban véletlenszerűen történt (Kohli és mtsi, 1977).

A *Schiz. pombe*-nél az első klónozott és egyben funkcionálisan leírt, a kénmetabolizmusban szerepet játszó gén az S-adenozilmetionin-szintáz (SAMS) enzimet kódoló *sam1* gén volt (Hilti és mtsi, 2000). Stacioner fázisban a SAM1p aktivitása csökken. Haploid sejtben a *sam1* gén csökkent mértékű expressziója az adott haploid sejtnek egy másik haploid sejtrel való konjugálásához vezet, ami azt mutatja, hogy a *sam1* gén működése létfontosságú. A *sam1* gén szekvenciája nagy homológiát mutat más élőlényeknél talált S-adenozilmetionin-szintáz enzimet kódoló génekkel (Hilti és mtsi, 2000).

Brzywczy és mtsi (2002) a *S. cerevisiae met25* mutáns törzsét transzformálták *Schiz. pombe* cDNS könyvtárral, majd az izolált rekombináns plazmidon megtalálták a homocisztein-szintáz enzimet kódoló gént (GenBank No. AF012876). A fehérje több mint 60 %-os azonosságot mutat más mikroorganizmusoknál talált homocisztein-szintáz enzimmel. E kutatócsoportnak már korábban sikerült bizonyítani, hogy a hasadó élesztőgomba nem rendelkezik sem cisztation- $\beta$ -szintáz, sem pedig cisztation- $\gamma$ -liáz enzimaktivitással. E két enzim hiányából adódóan nem lennének képesek metioninból ciszteint szintetizálni, valamint a metionin jelenléte nem befolyásolhatná a szulfát asszimilációját (Brzywczy és Paszewski, 1994). Több kutatócsoport eredményei szerint azonban a metionin megfelelő kénforrás mind a prototróf, mind pedig a metionin auxotróf törzseknek (Kohli és mtsi, 1977; Brzywczy és mtsi, 2002). A kérdés megoldásához a munkacsoportunk által előállított szelenát-rezisztens, ATP-szulfuriláz aktivitásukat veszített mutánsok vizsgálata vezetett, amelyek nem voltak képesek a metionint, mint egyedüli S-forrást hasznosítani (Bánszky és mtsi, 2003). A szerzők feltételezése szerint a metionin hasznosítása során a metionin teljes mértékben lebomlik, kéntartalma pedig a szulfát-asszimilációs úton keresztül hasznosul. Ez az út a jelzett szelenát-rezisztens mutánsoknál azonban nem működik.

A legújabb irodalmi adatok szerint két metionin szintézisben szerepet játszó gént sikerült izolálni. Mindkét gén, *met9* és a *met11*, a metilén-tetrahydrofolát-reduktáz enzimet kódolja. Bár 38 %-os homológiát mutatnak, meglepetésre, mégsem képesek egymást komplementálni (Naula és mtsi, 2002).

Naula és mtsi (2002) megfigyelték, hogy a metionin fontos szerepet játszik a hasadó élesztőgomba szaporodásában is. Az ammónium-ion represszálja mind az ivaros szaporodást mind pedig a sporulációt, azonban a metionin ezt a gátlást ellensúlyozza az *ste11* transzkripciós aktivátort kódoló gén indukálásával (Schweingruber és mtsi, 1998). A metionin metabolizmus és a szaporodás kapcsolatának vizsgálatára Schweingruber és mtsi további metionin auxotróf mutánsokat izoláltak. A mutációt szenvedett gének elnevezését a már térképezett Kohli törzsekkel való összetévesztés elkerülése végett *met6*-tól folytatták. Az általuk izolált metionin auxotróf mutánsokban a következő enzimeket kódoló géneket inaktiválták: homoszerin-acetiltranszferáz (*met6*), cisztation- $\gamma$ -szintáz

(*met7*), metilén-tetrahydrofolát-reduktáz (*met9*, *met11*; Naula és mtsi, 2002). A *met10* pedig a *met9* gén represszora (Schweingruber, személyes közlés).

## 2.2 A szelenát-rezisztencia és a szulfát hasznosítás kapcsolata különböző mikroorganizmusoknál

A szelenát ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), a molibdenát ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) és a wolframát ( $\text{WO}_4^{2-}$ ) ion a szulfát ion ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) szerkezeti analógja. Mindhárom szulfát analóg a szulfát-permeáz segítségével jut be a sejtbe, tehát jelenlétük a tápközegben kompetícióval gátolhatja a szulfát felvételt. A molibdenát és wolframát iontól eltérően a szelenát ion a szulfát asszimilációs úton tovább redukálódik szelenitté, amely bizonyos koncentrációban a sejt pusztulásához vezethet. A szelenát ion *S. cerevisiae*-re gyakorolt toxikus hatásának mechanizmusa már jól ismert. A szelenát ion a sejtben a szulfát asszimilációs úton keresztül a sejt számára toxikus hatású szelenitté ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) redukálódik. A szelenit toxikus hatása a redukációs út során keletkezett nagy mennyiségű  $\text{H}_2\text{O}_2$  illetve  $\text{O}_2^-$  ionnak tulajdonítható (Pinson és mtsi, 2000). A szelenit ion tolerancia a sejt detoxikációs mechanizmusától függ. E folyamat során a szelenit ion nem enzimatis úton a redukált glutationnal lép reakcióba, amelynek során elemi szelén ( $\text{Se}^0$ ) keletkezik (Gharieb és mtsi, 1995). A szelén általános toxicitása abból adódik, hogy a kéntartalmú aminosavakba beépül a kénatom helyére. A szelént tartalmazó aminosavak megváltoztathatják a fehérjék harmadlagos szerkezetét, így az adott fehérje (enzim) inaktíválódhat (Lauchi, 1993).

Mint már említettem, a vad típusú *S. cerevisiae* törzsek a szulfátot egyedüli kénforrásként képesek hasznosítani. A szelenát ion bizonyos koncentrációban a sejt számára toxikus, vagyis a vad típusú sejtek szelenátra érzékenyek. Azonban, ha a szulfát felvételben vagy a redukációs út elején szerepet játszó valamelyik gén megsérül, a sejt nem lesz képes tovább a szulfátot kénforrásként hasznosítani, egyidejűleg viszont szelenátra rezisztenssé válik.

Különböző *Aspergillus* fajoknál leírt, az ATP-szulfuriláz enzimet kódoló génekben sérült mutánsok nem képesek a szulfátot egyedüli kénforrásként hasznosítani, és ezzel párhuzamosan szelenátra is rezisztensekké válnak (Arst, 1968; Buxton és mtsi, 1989; De Lucas és mtsi, 2001). Az *Aspergillus nidulans* szelenát-rezisztens mutánsait kromátra való érzékenységük szerint két komplementációs csoportba soroltak (sB<sup>-</sup> és sC<sup>-</sup>). A kromát rezisztens mutánsoknak (sB<sup>-</sup>) a szulfát permeáz génjük, míg a kromát érzékenyeknek (sC<sup>-</sup>) a szulfát-reduktáz enzimkomplexet kódoló génjük sérült. Meglepetésre az *Aspergillus nidulans*-nál a APS-kináz hiányos törzs a vad típusú törzssel összehasonlítva szelenát túlérzékenységet mutatott (Arst, 1968).

Smith és mtsi (1995) a *Saccharomyces cerevisiae*-nél szelenátra és kromátra rezisztens mutánsokat izoláltak. A mutánsok a szulfát és annak toxikus analógjainak (szelenát ion és kromát ion) transzportjéért felelős *SUL1* génben sérültek. A *S. cerevisiae*-nél a transzporter gének inaktíválásán kívül az ATP-szulfuriláz enzimet kódoló *MET3* gén, az APS-kinázt kódoló *MET14* gén, valamint a PAPS-reduktázt kódoló *MET16* gén mutációja is szelenát rezisztenciához vezet. Az előbb említett gének transzkripciójáért felelős regulátor gének (*MET4*, *MET28*, *CBF1*) inaktíválása esetén az enzimek génjei nem íródnak át, ezért a transzkripció aktivátorokat kódoló gének inaktíválása is szelenát rezisztenciához vezet. Ezzel ellentétben a *MET30* génben mutáns törzset szelenát túlérzékenységgel jellemezték (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

Shibagaki és mtsi (2002) az *Arabidopsis thaliana* növénynél írták le a szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító mutáns fenotípusát. A szulfát transzportereket kódoló gének (*Sulft1* és *Sulft2*) inaktíválása után a növény nem tudta a gyökereken keresztül felvenni a szulfátot, és a vad típusú törzshöz képest szelenátra rezisztens fenotípust mutatott.

Kutatócsoportunk *Schiz. pombe*-ből állított elő szelenát-rezisztens mutánsokat, amelyek egyidejűleg a szulfátot nem tudták egyedüli S-forrásként hasznosítani. (Bánszky és mtsi, 2003). A

mutánsok egyetlen komplementációs csoportba tartoztak, metioninen nem mutattak növekedést és nagyban lecsökkentett volt ATP-szulfuriláz aktivitásuk.

### 2.3 *Schiz. pombe* klónozó vektorok

A klónozások alapfeltétele egy klónozó vektor és a szelekciós markerben sérült gazdatörzs izolálása. A komplementáción alapuló klónozó vektorok esetében a metabolizmusban sérült auxotróf gazda a szelekciós markernek köszönhetően prototróffá válik. A szelekciós markerek másik formája a rezisztencián alapuló szelekció, amely során a szelektív génnek köszönhetően az érzékeny törzs a transzformálást követően az adott anyagra rezisztenssé válik. Az klónozó vektorként használt integrálódó plazmidok nem hordoznak autonóm replikációs szekvenciát, így az adott plazmid a sejt genomjába integrálódik, így az osztódást követően átjut az anyasejtből a leánysejtbe. A *S. cerevisiae* 2µm plazmidjából származó autonóm replikációs szekvencia (*ars*) plazmidba való klónozásának köszönhetően egy nagyobb hatékonyságú transzformációs eljárást lehet elérni, illetve a plazmid sejtben lévő kópiaszáma is nagyban növelhető.

A *Schiz. pombe*-nél két plazmid szelekciós marker használata terjedt el. Az elsőnél a *S. cerevisiae* *LEU2* génje komplementálja a *Schiz. pombe* *leu1*<sup>-</sup> mutánsát. A komplementációs arány elég jó, azonban egyes szelektív táptalajokon gátolt a pozitív telepek növekedése. A másik gyakran használatos szelekciós marker a *Schiz. pombe* *ura4* génje, amely az *ura4*<sup>-</sup> mutánszt képes komplementálni. Az utóbb említett mutáns törzset a *S. cerevisiae* *URA3* génje is képes komplementálni, azonban a gyenge expresszióknak köszönhetően csak abban az esetben, ha az *URA3* gén multikópiás plazmidon helyezkedik el.

A hasadó élesztőgombánál használatos ún. shuttle klónozó plazmidok az *ars* szekvencia és a szelekciós marker mellett bakteriális replikációs kezdetet (*ori*) és bakteriális szelekciós markert is tartalmaznak. Ilyen pl. az *ura4* szelekciós markert tartalmazó pUR18N (lásd ábra.) vektor is, amely még egy ún. MCS-ot (multicloning site, több hasító helyet tartalmazó rövid DNS szakasz), valamint a klónozott inzertek szkrínelésére használható *lacZ* gént is hordozza (Barbet és mtsi, 1992). A *lacZ* gén jelenléte lehetővé teszi a vektort génbankok készítésére.

A *S. cerevisiae* arginin-permeázt kódoló *CAN1* génjét használják a *Schiz. pombe* *can1*<sup>-</sup> mutánsának transzformálása során. A *can1*<sup>+</sup> sejt érzékeny az arginin toxikus analógiaként ismert kanavaninra, ezzel ellentétben a *can1*<sup>-</sup> mutáns arginin auxotróf/kanavanin-rezisztens. A *Schiz. pombe* gombánál használt további szelekciós markerek: *ade1* (vektor pNPT/ADE1-3), *ade6* (pNR210), *arg3* (paR3), *his3* (pSP3), *his7* (pEA500).

### 2.4 Borok almasavtartalom csökkentésének lehetősége *Schiz. pombe* élesztőgombával

Az erősen savas borban található nagy mennyiségű almasav az erjedés során mikrobiológiai úton csökkenhet. A *S. cerevisiae* és *S. bayanus* borélesztő törzsek a fermentáció alatt az almasav mennyiségének kismértékű (kb. 10%-át) képesek csak lebontani. A borban található almasav nagy hatásfokú mikrobiológiai lebontása elvileg kétféleképpen lehetséges: 1., a tejsavbaktériumok (elsősorban az *Oenococcus oenos*) a malolaktikus fermentációja során az almasavból tejsav keletkezik 2., a *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgomba maloetanolos fermentációja során az almasavból alkohol és CO<sub>2</sub> képződik.

Az almasav etanolos erjesztése *Schiz. pombe* élesztőgomba segítségével már régóta ismert konverziós folyamat. Dittrich (1963) valamint Mayer és Temperli (1963) írták le először e reakció stöchiometriáját:



Az általuk mért adatok szerint 1 g almasavból 0,343 g etanol keletkezik.

Az almasav anaerob körülmények között piroszőlósavvá, majd acetaldehiddé decarboxileződik, amelyet az alkohol-dehidrogenáz enzim etanollá redukál. Az almasav decarboxilezését végző, citoplazmában található malát-enzim mangán függő (Fuck és Radler, 1972). A 8. ábrából jó kivehető, hogy az almasav anaerob lebontása sem szén-, sem pedig energiaforrásként nem szolgál a sejt számára, ugyanis a malát-enzim által létrehozott NADH<sub>2</sub>-t az acetaldehid etanollá történő redukálása során az alkohol-dehidrogenáz felhasználja, az almasavnak pedig egyik C-atomja sem épül be az élesztőgomba szerves vegyületeibe.

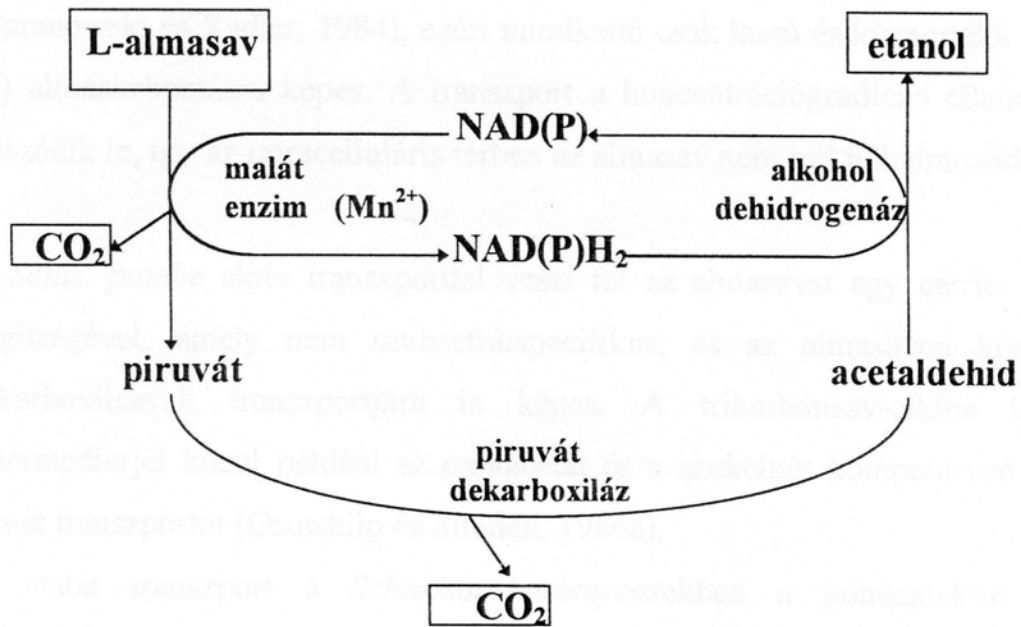
Manapság a borászatban a malolaktikus fermentáció terjedt el. Ennek az eljárásnak a hátránya, hogy magas SO<sub>2</sub> koncentrációnál, alacsony pH-nál, alacsony hőmérsékleten és magas alkohol tartalomnál nem megy végbe (Peynaud, 1984), míg a maloetanolos fermentáció alacsony pH-nál (Yang, 1973) és magas SO<sub>2</sub> koncentrációnál is folyik (Yang, 1975).

A maloetanolos eljárás hátránya, hogy az almasav lebontása során a bor gyümölcsös íze is eltűnik, valamint, hogy a fermentáció során nemkívánatos kéntartalmú íz- és aromaanyagok keletkeznek, többek között kén-hidrogén (Bidan és mtsi, 1974; Gallander 1977). A kén-hidrogén az élesztőgomba kénmetabolizmusának terméke és a bornak záptojásra emlékeztető szagot okoz. A kén-hidrogént és más kéntartalmú aromaanyagokat az élesztőgomba szerves (cisztein, metionin) vagy szervetlen (szulfát, szulfit) kénforrásokból állítja elő. E negatív hatások elkerülésére maloetanolos almasavbontás során különböző eljárásokkal próbálkoztak. Snow és Gallander (1979) az almasav koncentrációjának csökkentésére a mustot *Schiz. pombe* tenyésztéssel oltotta be. Az almasav mennyiség kívánt szintre csökkenése után a hasadó élesztőgomba sejteket eltávolították, majd borélesztővel oltották be a mustot. Azonban ez az eljárás nehézkes, valamint a *Schiz. pombe* sejtek teljes eltávolítása technológiailag nehezen oldható meg. A probléma megoldására az ún. rögzített sejtés eljárást kezdték alkalmazni. Ezzel a módszerrel kísérleti almasavbontást végeztek már mustban (Yokotsuka és mtsi, 1993), vörösborban (Magyar és Panyik, 1989) és fehérborban is (Ciani, 1995).

A bor almasavtartalmának csak részleges lebontásával már többen próbálkoztak. A maloalkoholos almasavbontás borászatban való alkalmazásával először Yang (1973) foglalkozott. A mustot *Schiz. pombe* tenyésztéssel oltotta be, majd második lépésként *S. cerevisiae* tenyésztet alkalmazott. Ethiraj és mtsi (1983) *S. cerevisiae* és *Schiz. pombe* élesztőgombák különböző arányú tenyésztéssel oltották be a mustot. Ipari körülmények között azonban ennek alkalmazása nehezen megoldható, valamint a fermentáció során nehéz lenne megjósolni a két élesztőgomba arányának alakulását. Taillandier és mtsi (1995) a *Schiz. pombe*-val beoltott musthoz különböző időközönként *S. cerevisiae* tenyésztet adtak, remélve, hogy a *S. cerevisiae* killer toxinja révén gátolja a hasadó élesztőgomba almasavbontásának aktivitását. Egy másik ún. két-lépcsős beoltási módszer szerint a musthoz először *Schiz. pombe* tenyésztet adnak, majd az almasavtartalom kívánt csökkenése, valamint a *Schiz. pombe* eltávolítása után a mustot *S. cerevisiae* tenyésztéssel oltják be (Yokotsuka és mtsai, 1993; Snow és Gallander, 1979). Hátránya ennek a módszernek a must szűrésének szükségessége. A *Schiz. pombe* sejtek egyszerű eltávolítására megoldást jelentene az immobilizált sejtek alkalmazása (Yokotsuka és mtsi, 1993; Magyar és Panyik, 1989; Ciani, 1995).

Az élesztős fermentáció alatt képződő kén-hidrogén a borászat mellett komoly problémát okoz a sörgyártás területén is. A sörélesztőknél a kén-hidrogén termelését a kén metabolizmusban szerepet játszó különböző gének klónozásával csökkentették. Tezuka és mtsi (1992) az *NHS5* gén klónozásával értek el eredményeket, mely a kén-hidrogén termelés szupresszorát kódolja, így sikerült csökkenteni a kén-hidrogén termelést. Omura és Shibano (1995) a *MET25* gént klónozták, amely a homocisztein-szintáz enzimet kódolja. Ez az enzim katalizálja az O-acetil-homoszerin kén-hidrogénnel való reakcióját (3. ábra). Mivel a homocisztein-szintáz enzim az adott törzsben nagyobb kópia számban volt jelen, így a homocisztein képződése során több szulfid használandott el,

ami a szulfid sejten belüli koncentráció csökkenéséhez vezetett. Mivel a kén-hidrogén termelés egyenes arányban van a sejten belül felgyülemlt szulfid mennyiségével, így az adott törzs kevesebb kén-hidrogént termelt.



**8.ábra.** L-almasav lebontása anaerob körülmények között *Schiz. pombe* élesztőgombával.

### 3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Mikroorganizmusok

Törzsek	Eredet	Megjegyzés
<i>S. pombe</i>		
L-972 h <sup>-</sup>	CBS <sup>1</sup> 7264	-
0-82 h <sup>-</sup> <i>ade5<sup>-</sup></i>	DE, GT <sup>2</sup>	L-972 h <sup>-</sup> adenin auxotróf mutánsa
B-579 h <sup>-</sup>	BCE, BT <sup>3</sup>	borból izolált törzs
D 18 h <sup>-</sup> <i>ura4<sup>-</sup></i>	DE, GT	uracil auxotróf
3-112 h <sup>-</sup> <i>met1-1</i>	UB <sup>4</sup>	metionin auxotróf
16-635 h <sup>+</sup> <i>met2-2</i>	UB	metionin auxotróf
3-117 h <sup>+</sup> <i>met3-1</i>	UB	metionin auxotróf
20-763 h <sup>+</sup> <i>met4-6</i>	UB	metionin auxotróf
0-162 h <sup>-</sup> <i>met5-1</i>	UB	metionin auxotróf
0-82 h <sup>-</sup> <i>ade5<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2</i>	BCE, MBT <sup>5</sup>	szelenát rezisztens
B-579 h <sup>-</sup> <i>Se<sup>R</sup>-2</i>	BCE, MBT	szelenát rezisztens
L-972 h <sup>-</sup> <i>Se<sup>R</sup>-2</i>	BCE, MBT	szelenát rezisztens
0-121 h <sup>-</sup> <i>trp1<sup>-</sup> arg1<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2</i>	BCE, MBT	triptofán és arginin auxotróf szelenát rezisztens
<i>S. cerevisiae</i>		
CC371-4B Mata <i>his3 leu2 ura3 met3</i>	CGM <sup>6</sup>	hisztidin, leucin, uracil és metionin auxotróf
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	BCE, MBT	ampicillin érzékeny

**1. táblázat.** A munkám során használt törzsek.

<sup>1</sup> Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht & Delft, The Netherlands

<sup>2</sup> Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar, Genetikai Tanszék, Debrecen

<sup>3</sup> Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Borászati Tanszék

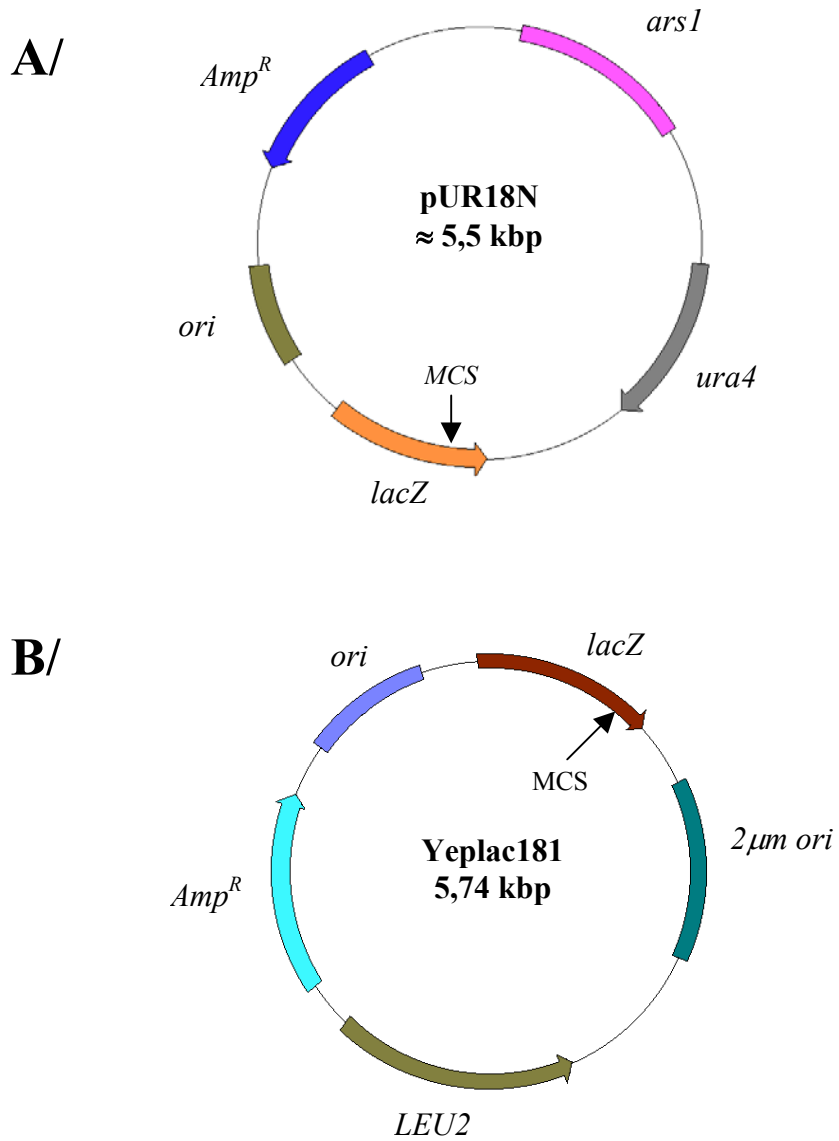
<sup>4</sup> University of Bern, Institute of Cellbiology, Bern, Switzerland

<sup>5</sup> Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

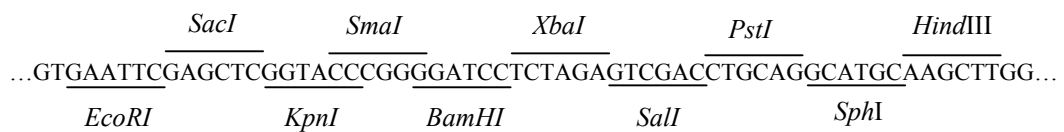
<sup>6</sup> Centre de Génétique Moléculaire, C.N.R.S., Gif-Sur. Yvette, France



### 3.2 Vektorok



MCS (multicloning site) mindkét esetben



9. ábra. A/ *Schiz. pombe* pUR18N és B/ *S. cerevisiae* Yeplac181 klónozó vektorok térképei.

### 3.3 Restriktációs enzimek, primerek

A kísérletekhez használt restriktációs enzimek:

*NotI* (Promega), *SphI* (Promega), *BamHI* (Promega), *PstI* (Promega)

A PCR alapú szekvenálásnál használt a primereket a 2. táblázat tartalmazza.

Primer elnevezése	szekvencia	GC tartalom (%-ban)	T <sub>m</sub> *
P-40	5'- AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'	41,7	58,6
P-47	5'- CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'	62,5	65,5
ST-1	5'-GTACTGCATCACATTTTCG-3'	44	53,2
ST-2	5'-TGTGAGCCTGACTGCTGT -3'	56	59,3
ST-3	5'-GCATTGGCATGTATTGCA -3'	44	50,8
ST-4	5'-TGCGAATTCTGTCCTCAT -3'	44	50,4
ST-5	5'-CAGATGCATCAGCATCAG -3'	50	49,9
ST-6	5'-CTACGGTTGGATTCTATT -3'	39	44,9
ST-7	5'-CTTCAAGCCGTTACTCCT -3'	50	50,7

\* - a "nearest neighbour" módszerrel számolva, sókoncentráció 50 mM

2. **táblázat.** A szekvenálásnál használt primerek

### 3.4 Táptalajok és tápoldatok

#### Komplett táptalaj (YEPD)

Glükóz	10 g/L
Élesztőkivonat	5 g/L
Pepton	5 g/L
Agar	20 g/L

#### Minimál táptalaj (MM)

Glükóz	10 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Agar	20 g/L

Wickerham-féle vitaminkeverék 1 mL/L

Összetétele:	0,2 mg folsav
	0,2 mg biotin
	40 mg Ca-pantoenát
	200 mg inozitol
	40 mg nikotinsav
	20 mg p-aminobenzoésav
	40 mg piridoxin.HCl
	40 mg tiamin.HCl
	20 mg riboflavin
	100 cm <sup>3</sup> desztillált vízben oldva.

Szükség esetén aminosavakkal, nukleotidokkal kiegészítve (leucin, hisztidin, uracil, metionin, cisztein, arginin, triptofán 10 mg/100 mL; adenin 4 mg/100 mL).

#### **Ozmotikusan stabilizált minimál táptalaj (OMM)**

MM táptalaj

KCl	0,6 M/L
vagy	
szorbit	0,9 M/L

#### **Minimál táptalaj kénforrás nélkül (MM-S<sup>-</sup>)**

Glükóz	10 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Wickerham-féle vitaminkeverék	1 mL/L
Agar	20 g/L

Szükség esetén aminosavakkal, nukleotidokkal kiegészítve.

#### **MB tápleves**

Glükóz	5 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
NaCl	0,1 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
Kálium-acetát	0,36 g/L
Wickerham-féle vitaminkeverék	1 ml/L

Szükség esetén aminosavakkal, nukleotidokkal kiegészítve.

#### **LB táptalaj**

Tripton	10 g/L
NaCl	10 g/L
Élesztőkivonat	5 g/L
Agar	20 g/L

Szükség esetén 100 µg/ml koncentrációjú ampicillinnel kiegészítve.

#### **YED tápleves**

Glükóz	30 g/L
Élesztőkivonat	5 g/L

#### **Éheztető tápleves**

Glükóz	10 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
MgCl <sub>2</sub>	0,5 g/L

### **Almasavas tápleves**

Glükóz	10 g/L
L-almasav	5 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,75 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
Élesztőkivonat	3 g/L
Pepton	5 g/L
Etanol (autoklávozás után hozzáadva)	100 mL/L

### **Benomilos táptalaj (BEN)**

3 mg benomilt 1 mL 96 %-os etanolban oldunk és 55 °C-ra hűtve a steril YEPD táptalajhoz adjuk az adott koncentrációban.

## **3.5 Oldatok**

### **Protoplasztáló enzimoldat**

2 mg lysing enzim (*Trichoderma harzianum*, Sigma) 1 mL 0,9 M-os szorbitban oldva.

### **PEG-Ca<sup>2+</sup> oldat**

polietilén-glikol 4000 (Serva)	250 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,1 M/L

### **Lítium-acetát oldat**

Lítium-acetát	100 mM/L
Tris-HCl	10 mM/L
EDTA (pH=8,0)	1 mM/L

Bidesztillált vízben oldva és ecetsavval a pH 4,9 beállítva.

### **50%-os PEG-lítium-acetát oldat**

lítium-acetátos oldat 500 g/L 4000-es polietilén-glikollal (Serva) kiegészítve.

### **STE oldat**

szacharóz	50 mM/L
Tris-HCl	25 mM/L
EDTA (pH=8,0)	10 mM/L

### **SDS oldat**

SDS (Na-dodecil-szulfát)	10 g/L
NaOH	0,2 mM/L

### **Merkaptoetanol-EDTA oldat**

merkaptoetanol	10 mL/L
Tris-HCl	100 mM/L
EDTA (pH=8,5)	5 mM/L

### **Ammónium-acetátos oldatok**

a, 7,5 M-os oldat

7,5 M/L ammonium-acetát bidesztillált vízben oldva és pH=7,6-ra beállítva.

b, 2 M-os oldat

2 M/L ammonium-acetát bidesztillált vízben oldva és pH=7,4-re beállítva.

**TE puffer**

Tris-HCl	10 mM/L
EDTA (pH=8,0)	1 mM/L

**Lízis puffer**

Triton X-100	20 mL/L
SDS	10 mL/L
NaCl	100 mM/L
Tris-HCl pH=8	10 mM/L
EDTA	1 mM/L

**PCIA oldat**

Fenol:kloroform:izoamilalkohol 25:24:1 arányú oldata.

**TAE puffer (50x)**

Tris base	242 g/L
Jégecet	57,1 mL/L
EDTA (0,5 M; pH=8,0)	100 mL/L

**TBE puffer (10x)**

Tris base	108,0 g/L
Bórsav	55,0 g/L
EDTA (0,5 M; pH=8,0)	40 mL/L

**Kadmium-hidroxid oldat**

3CdSO <sub>4</sub> ·8H <sub>2</sub> O	4,3 g/L
NaOH	0,6 g/L

**Amin oldat**

Törzsoldat:

N,N-dietil-p-feniléndiamin-szulfát (Sigma) 0,75 M/L

Feloldva 11,3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ban.

Reagens:

A törzsoldatot 20-szorosra hígítottam 9 M-os H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ban, majd 1:12 arányban hozzáadtam 60 %-os (w/w) FeCl<sub>3</sub> oldatot.

**Jód oldat**

0,1 M I<sub>2</sub> törzsoldatot használat előtt 6,25 mM-ra hígítottam desztillált vízzel

**Nátrium-alginát oldat**

Nátrium-alginát 30 g/L

Vízfürdőben 100 °C-on feloldva és hőkezelve 30 percig.

### ATP-szulfuriláz reagens oldat

Foszfát-mentes víz	8 mL
40 mM MgCl <sub>2</sub>	4 mL
0,4 M Tris (pH=8 HCl-vel beállítva)	3 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	40 mg
Na <sub>2</sub> ATP	45 mg
Szerveetlen pirofoszfátáz	5 U (egység)

### Leállító oldat

0,5 M nátrium-acetát	18 mL
0,5 M ecetsav	100 mL

### Sejtfeltáró oldat

Foszfát-mentes víz	10 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,1 g
Nátrium-aszkorbát	0,2 g
Koncentrált H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10-20 µl

## 3.6 Módszerek

### 3.6.1 Szelenát-rezisztens mutánsok indukálása

A vad típusú törzs 24 órás 10<sup>7</sup> sejt/mL sejtkoncentrációjú tenyészetéből 2 mL-t Petri csészébe pipettáztam, majd 0, 30, 60, 90 és 105 másodpercig UV kezelést alkalmaztam. A sejtuszpenzióból 3 tagú, 10x-es hígítási sort készítettem, és a hígítási sorokból 100 µl-t YEPD táptalajra szélesztettem. Telepképzés után megállapítottam az élesztősejtek túlélési arányát a besugárzás nélküli kontrollhoz viszonyítva. A szelenát-rezisztens mutánsok előállítására a 10 %-os túlélési időt alkalmaztam. Mutagén kezelése után a sejteket 0,4 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> tartalmú YEPD táptalajra szélesztettem ki. A szelenát-rezisztens mutánsokat 4. napi növekedés után izoláltam.

### 3.6.2 Protoplaszt fúzió

Az élesztősejteket YEPD táplevesben 30 °C-on a késői exponenciális fázis eléréséig tenyésztettem. A lecentrifugált sejteket először steril vízzel, majd 0,9 M-os szorbittal mostam. 10 mL 2 %-os protoplasztáló enzimoldatot adtam a sejtekhez, majd 37 °C-on 80 rpm-mel rázattam, amíg protoplasztok nem képződtek. A protoplasztokat Bürker kamrában leszámoltam és mindkét szülői törzs sejtkoncentrációját 10<sup>8</sup> sejt/mL-re állítottam be, majd 1:1 arányban összekevertem. A centrifugálást követően a protoplasztok fúzióját 1 mL PEG-Ca<sup>2+</sup> oldattal indukáltam. Fél óra után a sejteket ozmotikusan stabilizált szelektív táptalajra szélesztettem.

### 3.6.3 Mitotikus szegregánsok indukálása benomilos táptalajon

A benomil koncentrációját YEPD táptalajon 2, 4, 8, 10, 12, 16, 24, 50 µg/mL-re beállítottam, majd az adott *Schiz. pombe* törzsnél meghatároztam a benomil minimális gátló koncentrációját (MIC). Ennek értéke 12 µg/ml volt. A diploid sejteket a MIC érték alatti koncentrációjú (8-10 µg/ml) benomilos táptalajra szélesztettem ki. 3-4 napi növekedés után a táptalaj felületéről telepeket izoláltam.

### 3.6.4 *Schizosaccharomyces pombe* transzformálása lítium-acetátos módszerrel

A tenyészetet MB minimál táplevesben az exponenciális fázis felső határáig tenyésztettem ( $OD_{600} \leq 0,5$ ). A sejteket kétszer mostam 4 °C-os lítium-acetát oldatban, majd ugyanabban az oldatban beállítottam a sejtkoncentrációt  $1-5 \times 10^9$  sejt/mL-re. Az így kapott sejtsuszpenziót Eppendorf csövekbe 100 µL-ként szétpipettáztam, majd 30 °C-on 60-120 percig inkubáltam. Az inkubációt követően a sejtekhez hozzámértem a plazmid DNS-t (1-5 µl) és a 30 °C-on tartott 50 %-os PEG-lítium-acetátos oldatot. A sejteket 60 percig 30 °C-on inkubáltam, majd 15 percig 43 °C-os vízfürdőben hőkezelttem. Utána a mintát 10 percig szobahőmérsékleten tartottam, majd a sejteket lecentrifugáltam. A centrifugálást követően a sejteket 1 mL YED táplevesben felszuszpendáltam, majd 30 °C-on 60-180 percig rázattam. Az inkubációt követően a sejteket szelektív táptalajra szélesztettem ki. A pozitív transzformánsokat az 5-7. napon izoláltam.

### 3.6.5 *Schizosaccharomyces pombe* sejtek transzformálása elektroporációval

Az élesztősejteket YEPD táplevesben 30 °C-on a késői exponenciális fázis eléréséig tenyésztettem. Ezután a sejteket kétszer mostam hideg vízzel, majd a következő oldatok egyikével kezeltem:

- 1/ 20 mM ditiotreitolt, 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 óra, 30 °C;
- 2/ 10 mM ditiotreitolt, 0,1 M lítium-acetát, 100 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 óra, 30 °C;
- 3/ 100 µg/mL lysing enzyme (Sigma) oldat, 30 perc, 37 °C.
- 4/ 1 % merkaptotanol, 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 15 perc, 30 °C

A sejteket a kezelés után kétszer mostam jéghideg 0,9 M-os szorbittal, majd  $2-3 \times 10^9$  sejt/mL sejtkoncentrációra felszuszpendáltam. 40 µl sejtsuszpenzióhoz 1 µL (kb. 250 ng) plazmid DNS-t adtam. A sejtsuszpenziót az elektroporációig jégen tartottam. Az elektroporációhoz a Gene Pulser (BioRad) készüléket használtam a következő paraméterekkel: 11,25 kV/cm, 25 µF, 200 Ω, 0,2 cm-es küvetta. Az elektroporáció után a transzformált sejteket 0,5 ml jéghideg 0,9 M-os szorbit oldatban felszuszpendáltam, majd szelektív táptalajra szélesztettem ki. Egy heti növekedést követően a 30 °C-on inkubált táptalajok felszínéről a kinőt telepeket izoláltam.

### 3.6.6 *Saccharomyces cerevisiae* transzformálása elektroporációval

YEPD táplevesben elszaporított egy éjszakás tenyészetből 100 mL-t lecentrifugáltam. A leülepedett sejteket kétszer átmostam hideg, desztillált vízzel, majd a sejteket 10 mL 1 %-os merkaptotanolos oldatban felszuszpendáltam. Az így elkészített mintát 30 °C-on 15 percig állni hagytam, majd kétszer hideg, desztillált vízzel átmostam. A centrifugálás után a leülepedett sejteket 0,2 mL 0,9 M-os szorbit oldatban felszuszpendáltam.

A később felhasználásra kerülő elektrokompetens sejtekhez glicerin oldatot mértem, hogy a glicerin végkoncentrációja 20 % legyen. Az így kapott sejtsuszpenziót -20 °C-on tároltam maximum egy hónapig. Felhasználás előtt a sejtsuszpenziót lecentrifugáltam, majd 0,9 M-os szorbitban újból felszuszpendáltam.

A 40 µL sejtsuszpenzióhoz 1 µL pDNS-t (kb. 300 ng) pipettáztam. Öt percig állni hagytam, majd a sejtsuszpenziót elektroporációs küvettaába átpipettáztam. Elektroporációnál a következő paramétereket használtam: 7,5 kV/cm, 25 µF, 200 Ω. Az elektroporációt követően a mintához 0,5 mL 0,9 M-os szorbitot mértem. Ezután a mintát szelektív táptalajra kiszélesztettem. A pozitív transzformánsok 5 napi növekedés után jelentek meg a szelektív táptalaj felszínén.

### 3.6.7 **Össz-DNS izolálása élesztőgombából**

Egy éjszakás élesztőgomba tenyészetből egy kacsnyit 1,5 mL desztillált vizet tartalmazó Eppendorf csőbe szuszpendáltam, vortexel összekevertem, majd lecentrifugáltam. A sejtekre 200  $\mu$ L lízis puffert, 0,3 g üvegyöngyöt és 200  $\mu$ L PCIA oldatot mértem, majd 3 percen keresztül vortexeztem. A vortexezést követően a mintához 200  $\mu$ L TE puffert adtam, újból vortexeztem, majd 5 percig maximális fordulatszámon lecentrifugáltam. A felső fázishoz 1 mL hűtött 96 %-os etanolt mértem és 20-30 percre mélyhűtőbe tettem. A hűtést követően a mintát 15 percig maximális fordulatszámon centrifugáltam, majd a peletre 50  $\mu$ g/mL koncentrációjú RNáz-t tartalmazó TE puffert mértem. Az így felfuszpendált mintát 30 percig 60 °C-on inkubáltam. Az inkubálás után a mintához 1 mL 96 % etanolt mértem és 10 percre –20 °C-ra tettem. Centrifugálás után a pelletet 70 %-os alkohollal mostam, vákuumszáritóban kiszáritottam, majd 50  $\mu$ L TE pufferban feloldottam.

### 3.6.8 ***Escherichia coli* sejtek transzformálása elektroporációval**

Az *Escherichia coli* törzset LB táplevesben 1 éjszakán át rázattam 37 °C-on. Az éjszakai tenyészetből 1 mL-t 100 mL LB táplevesbe átoltottam és  $OD_{600}=0,6$  értékig szaporítottam. Centrifugálást követően a sejtsuszpenziót kétszer hideg bidesztillált vízzel, majd 10 %-os glicerinnel oldattal mostam. A mosást követően a baktériumsejteket 0,3 mL 10 %-os glicerinnel oldatban felfuszpendáltam. Amennyiben a sejteket később használtam fel, akkor a sejtsuszpenziót kis mennyiségekben (~100  $\mu$ L) mélyhűtőben tároltam.

40  $\mu$ L sejtsuszpenzióhoz 1  $\mu$ L plazmid DNS-t adtam. Az elektroporációhoz a Gene Pulser (BioRad) készüléket használtam a következő paraméterekkel: 12,5 kV/cm, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ . A transzformáció után a sejtsuszpenzióhoz 1 mL LB táplevest mértem és 37 °C-on 1 órán át inkubáltam. Az inkubálás után a sejteket ampicillin tartalmú szilárd LB táptalajra szélesztettem. A pozitív telepek 24 órás tenyésztés után jelentek meg a táptalaj felszínén.

### 3.6.9 **Élesztőgomba plazmid felszaporítása *Escherichia coli*-ban**

A rekombináns ( $amp^R$ ) plazmidot tartalmazó élesztőgomba friss tenyészetéből össz-DNS-t izoláltam, majd ebből 1-2  $\mu$ L-t használtam fel *Escherichia coli* transzformálására. A transzformálást követően a sejteket ampicillint tartalmazó LB táptalajra szélesztettem, majd 37 °C-on inkubáltam. A pozitív transzformánsok 24 órás tenyésztés után jelentek meg a táptalaj felszínén.

### 3.6.10 **Plazmid DNS izolálása *Escherichia coli*-ból**

24 órás baktérium tenyészetből 3 mL-t lecentrifugáltam, majd a sejteket feloldottam 100  $\mu$ L RNáz-t tartalmazó (100  $\mu$ g/mL) STE oldatban. Ezután a felfuszpendált sejtekhez 200  $\mu$ L SDS oldatot mértem és jégre tettem. 5 perc után a mintához 150  $\mu$ L 7,5 M-os ammónium-acetátot adtam és további 5 percig jégen hagytam. A csapadékot ezután 15 perces maximális fordulatszámu centrifugálással üleptettem, majd a felülúszót Eppendorf csőbe pipettáztam és 0,6 térfogatnyi propilalkoholt mértem hozzá. Ezután a mintát 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd 10 percig centrifugáltam. A centrifugálás után az Eppendorf cső alján lévő csapadékot 100  $\mu$ L 2 M-os ammónium-acetátban feloldottam, majd 5 percig jégen tartottam. 5 perc centrifugálás után a felülúszóhoz 100  $\mu$ L propilalkoholt pipettáztam és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Centrifugálás után a csapadékot 70 %-os etanollal mostam, majd a pelletet kiszáritottam és 50  $\mu$ L TE pufferben feloldottam.



### 3.6.11 Szelenát-érzékenység vizsgálata

A 24 órás élesztőtényeszeteket 0,4; 2; 4; 6; 8; 10 és 12 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>-t tartalmazó minimál táptalajra oltókaccsal széleszttem. Kontrollként a transzformáláshoz használt szelenát-rezisztens törzset, valamint ennek vad típusú szelenátra érzékeny törzsét használtam. A növekedést 2 és 5 nap után értékeltem ki.

### 3.6.12 A klónozott DNS szakasz nagyságának meghatározása

Az *E. coli*-ból izolált plazmidokat különböző restrikciós enzimekkel megemésztettem. Az emésztés után kapott fragmentumokat 1 %-os agaróz gélen TBE pufferben futtattam (120 V, 2 óra). Markerként az  $\lambda$  lambda fág *Hind*III restrikciós enzimmel emésztett DNS-t vagy 1 kbp DNS markert (Biolabs) használtam. A futtatás végén a gélt a "GelDoc" (BioRad) szoftver segítségével értékeltem ki.

### 3.6.13 A DNS szakasz szekvenálása és analízise

A klónozott DNS szakasz nukleotid sorrendjét Perkin-Elmer automatikus DNS szekvenátor (ABI373 model) segítségével, a dideoxi láncterminációs módszerrel az Szegedi Biológiai Központban határoztam meg. A szekvenálás során használt primereket mindig a már megszekvenált DNS szakasz nukleotid sorrendje alapján szintetizáltattam (2. táblázat). A szekvenciát a BLASTN, BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a FramePlot 2.3.2. (<http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>; Ishikawa és Hotta, 1999), valamint a ClustralW ([http://decypher.stanford.edu/index\\_by\\_algo.htm](http://decypher.stanford.edu/index_by_algo.htm), Thompson és mtsi, 1994) programok segítségével értékeltem ki.

### 3.6.14 A klónozott gén szubklónozása

Az *Sph*I restrikciós enzim segítségével egy kb. 2,3 kbp hosszúságú DNS szakaszt kivágtam a már klónozott kb. 4,5 kbp hosszú genomiális DNS-ből. A pUR18N plazmidot szintén *Sph*I restrikciós enzimmel megemésztettem, majd T4 DNS Ligáz (Promega) enzim segítségével a megemésztett pUR18N vektort a 2,3 kbp hosszú DNS szakasszal szobahőmérsékleten ligáltattam 3 óráig. Az így kapott eleggyel *Schiz. pombe* S-18-82 *ura*<sup>4</sup> Se<sup>R</sup> élesztőtörzset transzformáltam. A transzformálás után a pozitív transzformánsokat minimál táptalajon szelektáltam, amely kénforrásként csak szulfátot tartalmazott. A telepek 5 napi növekedés után jelentek meg a táptalaj felszínén. Vizsgáltam az izolált törzsek szelenát érzékenységét is.

### 3.6.15 A klónozott gén átvitele *S. cerevisiae* vektorba

A *Schiz. pombe* rekombináns vektorból a szubklónozott ATP-szulfuriláz gént *Sph*I restrikciós enzim segítségével kivágtam és gélelektroforézissel elválasztottam. A klónozott gént a géldarabból Wizard PCR Preps (Promega) nevű kit segítségével izoláltam. A klónozáshoz használt YEplac181-es vektort szintén *Sph*I restrikciós enzimmel megemésztettem, majd alkálikus-foszfátáz enzimmel kezeltem (30 perc, 37 °C). A vektort a kivágott DNS szakasszal T4 DNS Ligáz (Promega) enzim segítségével szobahőmérsékleten 3 órán keresztül ligáltattam. Az így keletkezett ligátummal *Saccharomyces cerevisiae* törzset transzformáltam. A pozitív transzformánsokból plazmidot izoláltam.

### 3.6.16 Kén-hidrogén termelés mérése

A kén-hidrogén termelés mennyiségének meghatározásához a Jiránek és mtsi (1995) által leírt módszert használtam. A sejteket  $2 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban 150 ml YEPD táplevesbe oltottam, majd 24 órán keresztül szobahőmérsékleten tenyésztettem (30-40 fordulat/perc). Mivel a kéntartalmú anyagok fény hatására könnyen lebomlanak, a lombikot alufóliával befedtem. 24 óra után a tenyészetben 10 percig nitrogéngázt vezettem keresztül, amely a folyadékból felszabadította a gázokat, köztük a kén-hidrogént. A tenyészetből felszabaduló gázokat gumicső segítségével kadmium-hidroxid oldaton vezettem keresztül. A felszabaduló kén-hidrogén a kadmium-hidroxiddal reakcióba lép és kadmium-szulfid keletkezik, amelyet további kémia reakcióval mutattam ki.

A levegőztetés után 325  $\mu$ l ún. amin-oldatot adtam a kadmium-hidroxid oldathoz, és a mintát 1 percig kézzel ráztam. Ezután fél óráig állni hagytam, majd az oldat abszorbanciáját 670 nm-en mértem. A kén-hidrogén mennyiségét az előre megszerkesztett kalibrációs görbe segítségével határoztam meg.

### 3.6.17 Sejtek rögzítése Na-algináttal

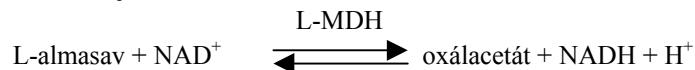
A sejteket egy éjszakán át YEPD táplevesben tenyésztettem. Centrifugálás után a sejtekből  $5 \cdot 10^8$  sejt/mL koncentrációjú sejtuszuspenziót készítettem. Az így elkészített sejtuszuspenziót 3 %-os nátrium-alginát oldattal 1:3 arányban összekevertem. Összekeverés után az oldatot büretta segítségével lassú keverés mellett 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  oldatba csepegtettem. A csepegtetést követően a rögzített sejteket még 2 órán keresztül  $\text{CaCl}_2$  oldatban állni hagytam. Az így kapott, rögzített sejteket tartalmazó gyöngyöket kétszer steril desztillált vízzel átmostam, majd egy éjszakán keresztül 4 °C-on tároltam. Használat előtt a gyöngyöket még egyszer steril desztillált vízzel átmostam.

### 3.6.18 Almasavtartalom meghatározása enzimes teszttel

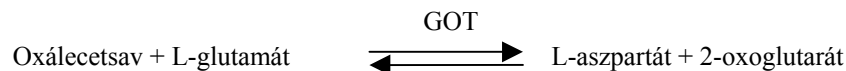
A borból illetve az almasav táplevesből kivettem 10 mL mintát, majd lecentrifugáltam. A felülúszó almasav tartalmát L-almasav teszttel (Boehringer Mannheim) a gyártó utasítása szerint határoztam meg.

Az almasav teszt elve:

Az L-almasavat az L-malát-dehidrogenáz (LMDH) NAD koenzim segítségével oxálacetáttá oxidálja:



A reakció egyensúlya az L-almasav képződés felé tolódik el, azonban az oxálecetsav eltávolítása a reakcióból az egyensúlynak oxálecetsav felé való eltolódását okozza. Az oxálecetsav L-aszpartáttá alakul L-glutamát jelenlétében, amely reakciót a glutamát-oxálacetát-transzamináz (GOT) enzim katalizál.



Az első reakcióban keletkezett NADH mennyisége stöchiometrikus az L-almasav mennyiségével.

Az NADH mennyiségét 334 vagy 365 nm-en mértem, és a kapott abszorbancia és a gyártó által megadott összefüggés segítségével kiszámoltam az L-almasav mennyiségét.

### 3.6.19 ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának mérése

A *Schiz. pombe* élesztőgomba törzset minimál táptalajon az exponenciális fázisig tenyésztettem, majd  $10^9$  sejtet lecentrifugáltam és 0,5 mL 10 mM-os Tris oldatban felszuszpendáltam. A sejtszuszpenziót Eppendorf csőbe átpipettáztam és a mintához üvegyöngyököt adva mechanikusan feltártam (20-szor 1 percig keverve). A fehérjék inaktiválásának elkerülése végett az egyes feltárások között a mintát 1 percig jégen tartottam. A feltárás végén a sejtszuszpenziót maximális fordulatszámon centrifugáltam, hogy a sejtmaradékokat elválasszam a felszabadult fehérjétől. A felülúszó ATP-szulfuriláz enzimaktivitását Segel és mtsi (1987) által leírt módszer alapján határoztam meg: 0,1 mL hígított mintához 0,4 mL reagens oldatot mértem és 60 percig 30 °C-on inkubáltam. Az inkubálást követően a reakcióelegyhez 1 mL leállító, majd 0,2 mL feltárási oldatot pipettáztam. 20 perc eltelte után a szervesen foszfát tartalomnak köszönhetően a minta színe kékre változott, amelynek abszorbanciáját 660 nm-en mértem. Az enzimaktivitás egység (U) definíciója: egy milliliter reakcióelegy által egy perc alatt felszabadított nmól foszforsav maradék (Pi).

## 4 CÉLKITŰZÉSEK

A munkám során két a munkacsoportunkban korábban izolált és a kísérleti munkák alapját képező *Schiz. pombe* szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító (később csak rezisztens) mutánsokat (0-82 *ade5<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup>-2, B-579 Se<sup>R</sup>-2) szerettem volna megvizsgálni genetikai, molekuláris-biológiai illetve fiziológiai szempontból.

A kitűzött célok a következők voltak:

- A tanszéki munkacsoport által korábban izolált szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító mutánsoknál a sérült gén azonosítása klónozással. Ennek érdekében ki kellett dolgozni egy nagyhatékonyságú transzformációs eljárást, amely a mutánsnak *Schiz. pombe* génbankkal való transzformálását szolgálta.
- A szulfát redukciós út sérült enzimét kódoló gén izolálása, szubklónozása, azonosítása majd jellemzése.
- A klónozott gén *S. cerevisiae*-ben való kifejeződésének vizsgálata.
- A klónozott gén szelekciós markerként való felhasználhatóságának vizsgálata klónozó vektor kifejlesztéséhez.
- Annak vizsgálata, hogy a vad típusú és a szelenát-rezisztens törzsek ATP-szulfuriláz enzimaktivitása és kén-hidrogén termelése változott-e.
- A szelenát-rezisztens mutánsok inaktivált génjének lokalizálása a *Schiz. pombe* géntérképén, annak vizsgálata, hogy allélikus lehet-e a korábban Kohli és mtsi (1975) által térképezett *Schiz. pombe met1-met5* gének valamelyikével.
- Rögzített sejtes rendszerben megvizsgálni a szelenát-rezisztens mutánsok borászatban biológiai almasavbontásra való alkalmazhatóságát.

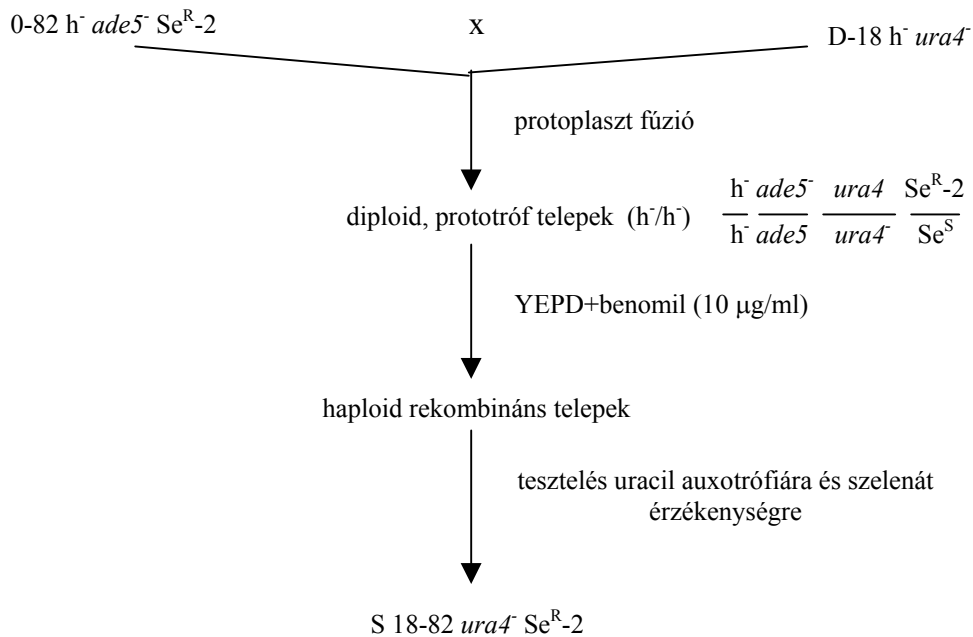
## 5 EREDMÉNYEK

### 5.1 Uracil-hiányos, transzformálható törzs előállítása hibridizációval

A *Saccharomyces cerevisiae*-nél a szulfát redukciós út 4 lépésében szereplő hét gén inaktiválása okozhatja a szelenát-rezisztens fenotípus megjelenését: a szulfát permeázok génjei (*SUL1*, *SUL2*), az ATP-szulfuriláz gén (*MET3*), az APS-kináz gén (*MET14*), a PAPS reduktáz gén (*MET16*) és a transzkripció aktivátorokat kódoló gének (*CBF1*, *MET4*, *MET28*; Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

A tanszéken korábban izolált *Schiz. pombe* szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító mutáns inaktivált génjének azonosítását tűztem ki célul. A *Schiz. pombe* szulfát-redukciós út mutáns génjének azonosításához a génbank szkrinelési módszert alkalmaztam. A génbank szkrineléshez három *Schiz. pombe* törzsből készített pUR18N plazmid alapú (9. ábra) génbank állt rendelkezésemre, amelyet dr. Benkő Zsigmond bocsátott rendelkezésemre (Benkő és mtsi, 1998). A vektor szelekciós markerként a *Schiz. pombe ura4* gént tartalmazta. Mivel egyik általunk izolált szelenát-rezisztens törzs sem hozdozta az *ura4* auxotrófia mutációt, ezért első lépésként egy *ura4*<sup>-</sup>, szelenát-rezisztens törzs előállítása volt a cél hibridizációval. A szelenát-rezisztens törzsek közül az egyik jellemzett törzs a 0-82 *ade5*<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2-es mutáns törzs volt, ezért a klónozó gazdatörzs előállításához ezt a törzset választottam ki. Ezt a szelenát-rezisztens törzset Bánszky Luca UV mutagenézist követően 0,4 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>-ot tartalmazó komplex táptalajon izolálta. A 0-82 *ade5*<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2-es törzs szulfátot illetve metionint egyedüli kén forrásként nem képes hasznosítani, viszont szelenátra mért MIC-je 100-szor nagyobb vad típusú párjával (0-82 *ade5*<sup>-</sup> Se<sup>S</sup>) összehasonlítva. Első lépésként a D-18 *ura4* transzformálható törzs és a 0-82 *ade5*<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2 törzs hibridizációjával diploid sejteket szerettem volna előállítani. Mivel mindkét törzs azonos párosodási típushoz (*h*) tartozott, ezért a két törzs hibridizációjához protoplaszt fúziót alkalmaztam. A két auxotróf törzs fúziója után a komplementálódott (diploid) prototróf sejteket minimál táptalajon izoláltam. A prototróf hidridek közül kiválasztottam egyet (D-18/0-82-1), amelyből benomilt tartalmazó YEPD táptalajon haploiditációt indukáltam. A benomil antifungális hatóanyag aneuploiditásokon keresztül haploidok kialakulásához vezet.

A protoplaszt fúzió után a D-18/0-82-1-es törzsnél először meghatároztam benomil minimális gátló koncentrációját (MIC), amely 12 µg/mL volt. A benomilos táptalajon a 3. napi növekedést követően kinőtt telepek közül szelektáltam az uracil auxotróf, szelenát-rezisztens telepeket, amelyek közül az S 18-82 *ura4* Se<sup>R</sup>-2 törzset használtam a további klónozási kísérletekhez. A folyamatot a 10. ábra mutatja.



10. ábra. Transzformálható szelenát-rezisztens törzs előállításának menete.

## 5.2 Nagyhatékonyságú transzformációs eljárás kidolgozása az S 18-82 ura4<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2 törzsre

Az *Schiz. pombe* S 18-82 ura4<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2 törzs génbankkal való transzformálása előtt egy nagyhatékonyságú transzformációs eljárás adaptálása vagy kidolgozása volt a céлом. A *Schiz. pombe*-nél a lítium-acetátos transzformációs módszer alkalmazása az elterjedt (Okazaki és mtsi., 1990). Ennél a módszernél a lítium-acetát fellazítja a sejtfalat és dezorganizálja a membránt, így az idegen DNS bejut a sejtbe. Az elektroporációs módszernél intakt sejtfalon keresztül vagy a sejtfal fellazítása után az idegen DNS elektromos impulzus segítségével jut be a sejtbe. Ezt az eljárást főleg a *Saccharomyces cerevisiae*-re dolgozták ki.

Céлом az volt, hogy mindkét módszert kipróbálva az S 18-82 ura4<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2 törzsnél a lehető legnagyobb transzformációs gyakoriságot érjem el, mivel kb. 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> transzformáns/µg DNS szükséges a génbank szűréséhez. Összehasonlítás céljából az újjonnan létrehozott S 18-82 ura4<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2 törzsen kívül az egyik jól transzformálható szülő törzset (D-18 ura4<sup>-</sup>) is alávettem ezeknek a kísérleteknek. A nagyhatékonyságú transzformációs eljárás kidolgozásához a genomiális génbank készítésénél alapul szolgáló pUR18N plazmidot használtam. A transzformáció után a sejteket a D-18 ura4<sup>-</sup> törzs esetében minimál táptalajra, míg az S 18-82 ura4<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2 törzs esetében ciszteinnel kiegészített minimál táptalajra szélesztettem ki.

Feszültséggradiens	Törzs	Túlélési arány (%)	Transzformációs gyakoriság (transzformáns/μg pDNA)
3,75 kV/cm	D-18 <i>ura4</i>	53 %	0
	S 18-82 <i>ura4</i> Se <sup>R</sup> -2	46 %	0
7,5 kV/cm	D-18 <i>ura4</i>	17 %	2x10 <sup>3</sup>
	S 18-82 <i>ura4</i> Se <sup>R</sup> -2	14 %	5,2x10 <sup>2</sup>
10,0 kV/cm	D-18 <i>ura4</i>	16 %	3,9x10 <sup>3</sup>
	S 18-82 <i>ura4</i> Se <sup>R</sup> -2	12 %	1,3x10 <sup>3</sup>
11,25 kV/cm	D-18 <i>ura4</i>	6 %	2,2x10 <sup>4</sup>
	S 18-82 <i>ura4</i> Se <sup>R</sup> -2	5 %	1,5x10 <sup>4</sup>

**3. táblázat.** *Schiz. pombe* D-18 *ura4* és S 18-82 *ura4* Se<sup>R</sup>-2 törzsek transzformációs gyakorisága pUR18N vektorral történő elektroporáció után. Az elektroporáció során az ellenállás 200 Ω és a kapacitás 25 μF volt.

Először a lítium-acetátos módszerrel transzformáltam a két törzset. A D-18 *ura4* törzsnél 10<sup>4</sup> transzformáns/μg pDNS gyakoriságot, míg az S 18-82 *ura4* Se<sup>R</sup>-2 törzsnél 6.10<sup>3</sup> transzformáns/μg pDNS gyakoriságot sikerült elérnem. A *Schiz. pombe*-re elektroporációs eljárást az irodalomban nem találtam, ezért először optimalám a paramétereket. Négy különböző feszültséggradienst próbáltam ki: 3,75; 7,5; 10,0 valamint a 11,25 kV/cm, miközben a kapacitás 25 μF és az ellenállás 200 Ω volt. A kísérletet ditiotreitollal kezelt sejteken végeztem el. A túlélési arány meghatározása végett az elektroporáció végen a sejtszuspenzióból hígítási sort készítettem, majd a sejteket YEPD táptalajra kiszélesztettem. Az eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

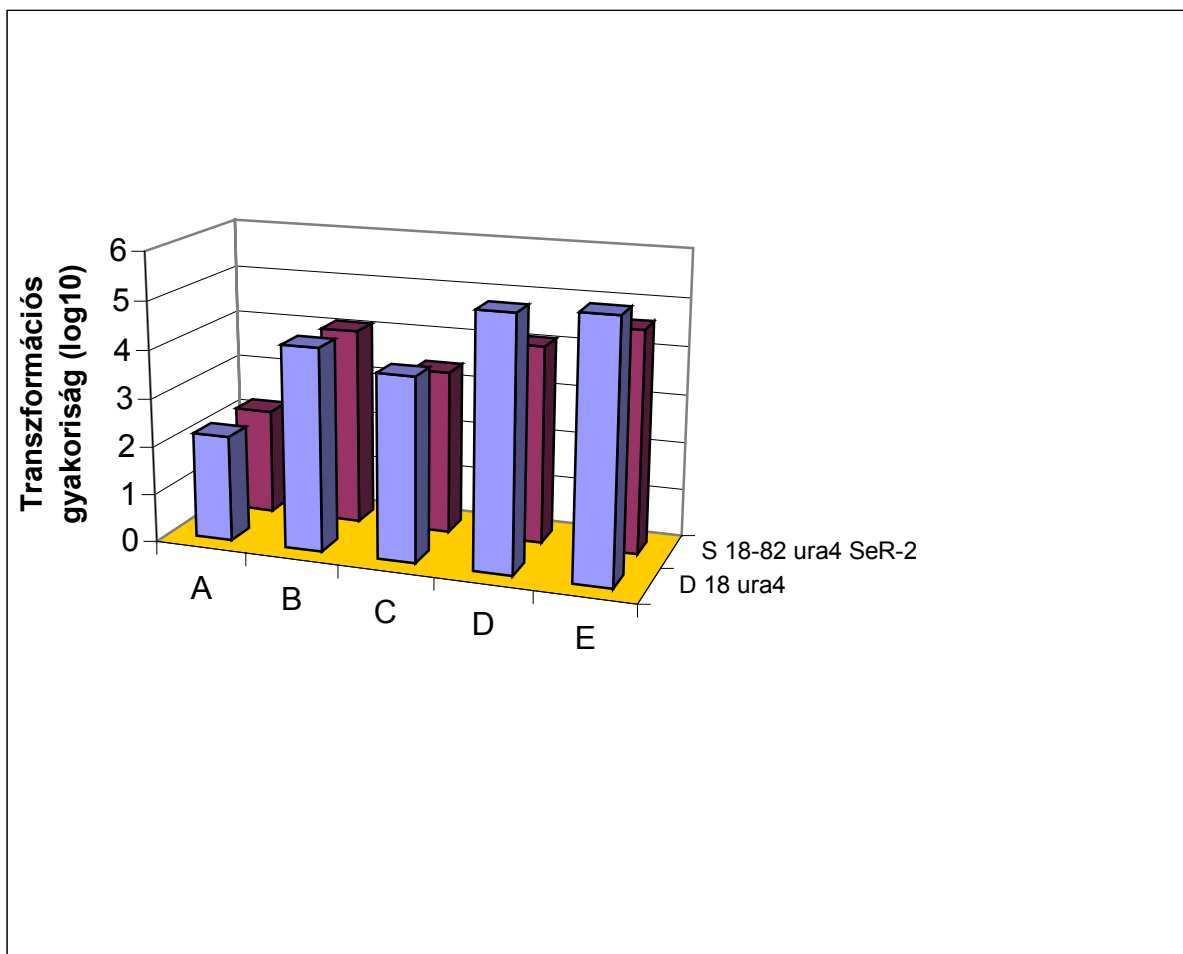
Az eredményekből kitűnik, hogy a legnagyobb (11,25 kV/cm) feszültséggradiensnél sikerült elérnem a legnagyobb transzformációs gyakoriságot. A 3,75 kV/cm feszültséggradiens alkalmazásánál nem kaptam transzformáns, viszont kétszer nagyobb feszültségnél (7,5 kV/cm) a transzformációs gyakoriság mindkét törzs esetében nőtt, miközben a túlélési arány csökkent. A további elektroporációs kísérleteknél a 11,25 kV/cm feszültséget használtam.

Az elektroporáció paramétereinek beállítása után különbözőképpen kezelt sejteket vettem alá az elektroporációnak. A sejteket külön-külön négyféle oldattal kezeltem: merkaptotanolos, ditiotreitolos, lítium-acetát+ditiotreitolos valamint sejtfololdó enzimet (lysing enzime) tartalmazó oldatban. A felsorolt vegyületek közül a merkaptotanol illetve a ditiotreitoll a sejtfolban lévő fehérjék diszulfid kötéseit redukálja, a lítium-acetát pedig a sejtfolat és a sejtmembránt lazítja fel, míg a sejtfololdó enzim glükánáz, mannanáz és kináz aktivitásának köszönhetően a sejtfol komponenseket emészt meg. A különféle előkezelések után kapott transzformációs gyakoriságokat a 4. táblázat, illetve a 11. ábra tartalmazza.

Mind a négy kezelés után a D-18 *ura4* szülői törzsnél nagyobb transzformációs gyakoriságot kaptam, mint a S 18-82- *ura4* Se<sup>R</sup>-2 általam izolált szelenát-rezisztens törzs esetében. Az eredményekből kitűnik, hogy a ditiotreitoll+lítium-acetát illetve a lysing enzyme oldatos kezelésnél kaptam a legjobb eredményeket, így a további, genomiális génbankkal való transzformálás során ezeket a kezeléseket alkalmaztam.

Kezelés	Törzs	Túlélési arány (%)	Transzformációs gyakoriság (transzformáns/ $\mu\text{g}$ pDNA)
Nem kezelt	D-18 <i>ura4</i>	14 %	$2,3 \times 10^2$
	S 18-82 <i>ura4</i> $\text{Se}^{\text{R}}-2$	13 %	$2,3 \times 10^2$
Ditiotreitolt	D-18 <i>ura4</i>	6 %	$2,2 \times 10^4$
	S 18-82 <i>ura4</i> $\text{Se}^{\text{R}}-2$	5 %	$1,5 \times 10^4$
2-merkaptoetanol	D-18 <i>ura4</i>	10 %	$8 \times 10^3$
	S 18-82 <i>ura4</i> $\text{Se}^{\text{R}}-2$	6 %	$4,5 \times 10^3$
Ditiotreitolt + lítium-acetát	D-18 <i>ura4</i>	14 %	$2,5 \times 10^5$
	S 18-82 <i>ura4</i> $\text{Se}^{\text{R}}-2$	9 %	$4,2 \times 10^4$
Lysing enzyme	D-18 <i>ura4</i>	8 %	$3,5 \times 10^5$
	S 18-82 <i>ura4</i> $\text{Se}^{\text{R}}-2$	5 %	$6 \times 10^4$

4. táblázat. A *Schiz. pombe* S 18-82 *ura4*  $\text{Se}^{\text{R}}-2$  és a D-18 *ura4* törzs transzformációs gyakorisága különböző kezelések után. Az elektroporáció paraméterei: 11,25 kV/cm, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ .



11. ábra. Különböző oldatokkal kezelt sejtek transzformációs gyakorisága. Az elektroporáció paraméterei: 11,25 kV/cm, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ . A-nem kezelt, B-ditiotreitolt, C-merkaptoetanol, D-ditiotreitolt+lítium-acetát, E-lysing enzyme.



### 5.3 Az S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup>-2 törzs transzformálása *Schiz. pombe* genomialis génbankokkal

Nagyhatékonyságú transzformációs eljárás ( $10^5$ - $10^6$  transzformáns/ $\mu$ g pDNS) az egyik alapfeltétele annak, hogy a génbankban a keresett gént megtaláljuk. Bár a feszültség beállítása után a ditiotreitolt+lítium-acetát illetve a sejtfaloldó enzimet tartalmazó oldatokkal kezelt sejtek esetében ennek alsó határát,  $10^4$ - $10^5$  transzformáns/ $\mu$ g pDNS sikerült csak elérnem, a génbank szűrésére ezeket a sejteket használtam fel. A génbankok szűrésénél az általam kidolgozott elektroporációs módszert alkalmaztam (11,25 kV/cm, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ). A szűréshez három génbankot használtam (5. táblázat; Benkő és mtsi, 1998).

Genomiális génbank	Jelzés	Inzertek nagysága (kbp)
pURC1	C1/2	1.8-8.0
pURC2L	C2L	4.6-8.0
pURC2S	C2S	3.1-4.6

5. táblázat. Az S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup>-2 törzs génbankkal való szkrinelésnél használt genomialis génbankok adatai.

Az elektroporáció során a C1/2 génbank esetében 10 (S 18-82/C1-10), míg a C2L esetében 3 (S 18-82/L1-3) pozitív transzformánst, melyek egyedüli kén forrásként szulfátot tartalmazó minimál táptalajon nőttek, sikerült izolálnom. Kezelésre vonatkozóan a ditiotreitolt+lítium-acetátos kezelésnél a C1/2-es génbankkal való transzformálás után 6, míg a C2L genomialis génbankot használva 1 pozitív transzformánst kaptam. A többi pozitív telepet a sejtfaloldó enzimes kezelés után izoláltam. A kontroll mintáknál, amelyekhez nem adtam pDNS-t, az elvárásoknak megfelelően nem kaptam pozitív telepeket. A C2S génbank esetében többszöri próbálkozás után sem sikerült pozitív telepet izolálni. Ez feltehetően a klónozott DNS inzertek rövidegének (max. 4.6 kbp) tulajdonítható.

### 5.4 A pozitív telepek szelenát érzékenységének vizsgálata

A génbankokkal való elektroporáció után a pozitív transzformánsokat minimál táptalajon izoláltam, amelyek a transzformáció alapjául szolgáló S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup> törzssel ellentétben a szulfátot egyedüli kénforrást képesek voltak hasznosítani. Egyidejűleg az *ura4* gén is komplementálta az *ura4* mutáns allélt. Az izolálás után megvizsgáltam a pozitív transzformánsok szelenátra való érzékenységét. A kísérletet három törzssel végeztem el: 0-82 *ade5<sup>-</sup>*, S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup>-2 és az S 18-82/C7 pozitív transzformánssal. A 0-82 *ade5<sup>-</sup>* törzs szelenát-érzékeny, míg a S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup>-2 törzs szelenát-rezisztens kontrollként szolgált.

A szelenát érzékenységet kétféle, ciszteinnel kiegészített táptalajon vizsgáltam: szulfátot tartalmazó minimál táptalajon (MM<sup>S<sup>O</sup>4</sup>), illetve kénforrás nélküli táptalajon (MM<sup>Cl</sup>). Az eredmények a 6. táblázatban vannak feltüntetve.

Táptalaj	Törzs	Nátrium-szelenát koncentrációja (mM/L)						
		0	0,4	2	4	6	8	10
MM <sup>Cl</sup> +cisztein	S 18-82 <i>ura4<sup>-</sup></i> Se <sup>R</sup> -2	+	+	+	+	+	+	+
	S 18-82/C7	+	-	-	-	-	-	-
	0-82 <i>ade5<sup>-</sup></i>	+	-	-	-	-	-	-
MM <sup>SO<sub>4</sub></sup> +cisztein	S 18-82 <i>ura4<sup>-</sup></i> Se <sup>R</sup> -2	+	+	+	+	+	+	+
	S 18-82/C7	+	+	+	+	(+)	-	-
	0-82 <i>ade5<sup>-</sup></i>	+	+	+	+	(+)	-	-

**6. táblázat.** Az S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup>-2, a 0-82 *ade5<sup>-</sup>* kontroll és az S 18-82/C7 transzformáns törzsek szelenát érzékenységének vizsgálata ciszteinrel kiegészített kénforrás nélküli táptalajon (MM<sup>Cl</sup>), illetve szulfátos minimál táptalajon (MM<sup>SO<sub>4</sub></sup>). Az eredményeket az 5. napi növekedés után értékeltem ki.

- + jó növekedés
- (+) gyenge növekedés
- nincs növekedés

Az eredményekből kitűnik, hogy a S 18-82/C7 pozitív transzformáns szelenát érzékenysége megegyezik a 0-82 *ade5<sup>-</sup>* törzsével. A szulfátot tartalmazó táptalaj esetében (MM<sup>SO<sub>4</sub></sup>) a tesztelt törzsek szelenátra vonatkozó MIC értéke sokkal nagyobb volt (kb. 20x), mint a kénforrásként csak ciszteint tartalmazó táptalaj (MM<sup>Cl</sup>) esetében. A két táptalaj közötti különbség azzal magyarázható, hogy a szulfát (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), illetve a szelenát ion (SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) is a szulfát-permeáz(ko)n keresztül jut be a sejtbe. Ez azt eredményezi, hogy a szulfátot tartalmazó táptalajon a két ion között kompetíció alakult ki a szulfát-permeáz aktív régiójáért. Ezzel ellentétben a szulfátot nem tartalmazó táptalajon a szulfát ion hiányának köszönhetően a szulfát-permeáz csak a szelenát ion transzportját végzi, vagyis a szulfátot nem tartalmazó táptalajon több szelenát ion jut be a sejtbe, mint szulfátot tartalmazó táptalajon. A harmadik, pozitív kontrollként használt S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup>-2 törzs a 10 mM/L koncentrációjú szelenátot tartalmazó táptalajon is jó növekedést mutatott, mind a szulfát-mentes, mind pedig a szulfát-tartalmú minimál táptalajon.

## 5.5 A klónozott DNS szakasz nagyságának meghatározása

A 13 pozitív transzformánsból megpróbáltam plazmidokat izolálni. A plazmid izolálási módszer gyenge hatásfokának köszönhetően többszöri próbálkozás után is csak 7 (C3, C4, C5, C7, C9, C10, L2) törzsből sikerült plazmidot izolálni. E 7 törzs esetében is az ampicillin rezisztens *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  telepek száma nagyon alacsony volt (1-20). A további kísérletekhez az S18-82/C7 (továbbiakban C7) pozitív transzformánsból izolált pDNS-t használtam. Először a C7-es plazmidban klónozott genomiális DNS szakasz nagyságát állapítottam meg. A pUR18N vektorban csak egy hasító hellyel rendelkező restrikciós enzimekkel (*NotI*, *SphI*, *PstI*, *BamHI*) hasítottam a C7-es plazmidot. Az elektroforézis után a *BamHI* illetve a *NotI* restrikciós enzimek esetében csak egy DNS sávot kaptam (lásd 18/A ábra). Ebből az következik, hogy ezeknek a restrikciós enzimeknek nincs hasítóhelyük a klónozott genomiális fragmentben. Az elektroforézis során használt  $\lambda$  fág *HindIII* restrikciós enzimmel hasított marker segítségével megállapítottam, hogy a C7-es plazmid nagysága kb. 10 kbp. Mivel a pUR18N vektor nagysága kb. 5,5 kbp (lásd 19. ábra),

ebből következik, hogy a C7-es plazmidban található genomiális DNS szakasz kb. 4,5 kbp nagyságú.

## 5.6 A klónozott genomiális DNS szakasz szekvenálása

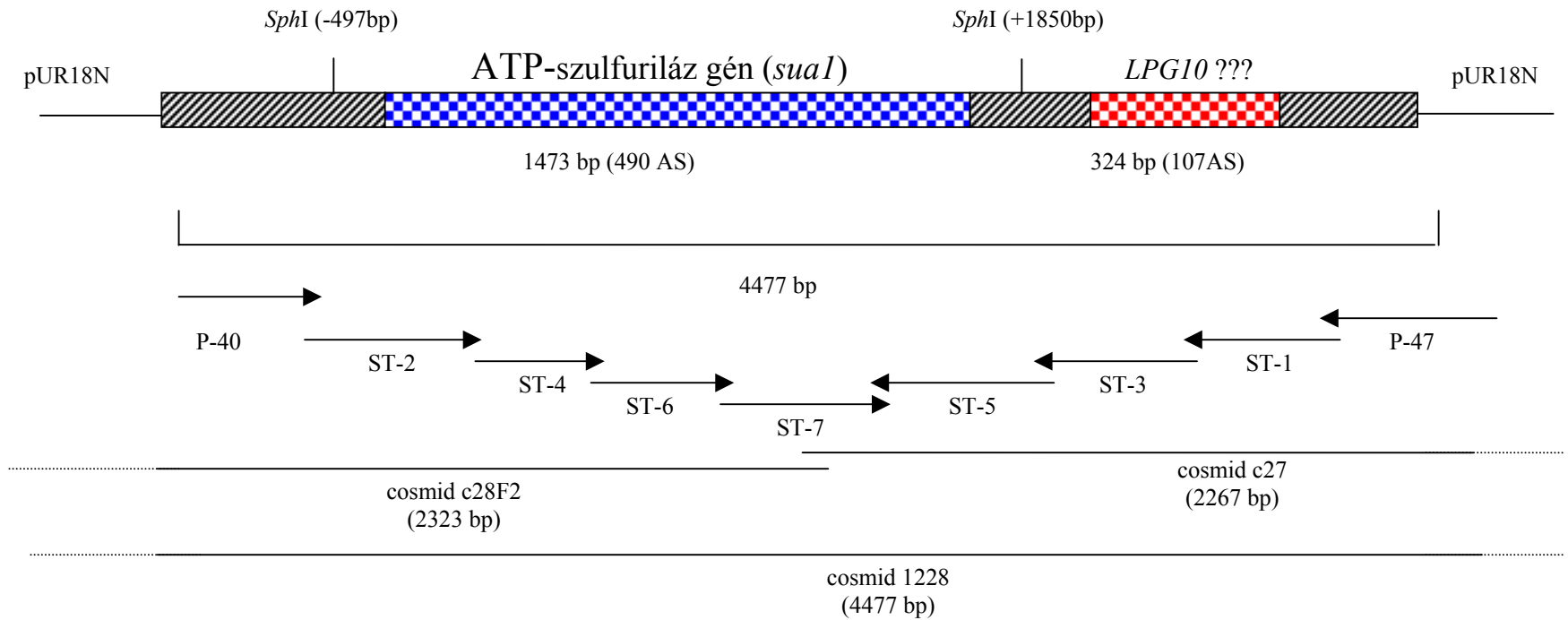
A C7-es plazmidban klónozott DNS szakasz nagyságának meghatározása után az adott fragmentet megszekvenáltam. Az első szekvenálást a pUR18N plazmidnál használható primerekkel végeztem el: az egyik oldalról a P-40, a másik oldalról pedig a P-47-es primerekkel. Minden egyes szekvenálásnál 600-650 bp hosszú szakaszt fogadtam el. Az újonnan megszekvenált DNS szakasz alapján új primereket szintetizáltam (ST1-ST7, lásd 12. ábra). A szekvenálást addig folytattam, amíg az újonnan szintetizált primerekkel megszekvenált DNS szakaszok össze nem értek. A szekvenálást követően megállapítottam, hogy a C7 klónból származó genomiális inzert hossza 4477 bp.

## 5.7 A klónozott inzert szekvenciájának összehasonlítása adatbázisokban található DNS szekvenciákkal

Homológ szekvenciákat keresve a klónozott DNS szakasz szekvenciáját összevettem a BLASTN, BLASTX adatbázisokban található *Schiz. pombe* szekvenciákkal. Az említett adatbázisokban három homológ DNS szekvenciát találtam, amelyek 1000 bp-nál hosszabb szakaszon mutattak homológiát a megszekvenált DNS szakasszal:

- a., *Schiz. pombe* chromosome II cosmid c27 (elérhetőségi száma az adatbankban No. AL353866.1).
- b., *Schiz. pombe* chromosome II cosmid c28F2 (No. AL121795.1).
- c., *Schiz. pombe* chromosome II cosmid 1228 (No. D83992.1).

Mindhárom az általam megszekvenált genomiális DNS szakasszal homológ kozmid a *Schiz. pombe* "GENOM PROJECT" részeként lett megszekvenáltatva (Wood és mtsi, 2002). Az első illetve a második talált DNS szakasz csak 2267 bp illetve 2323 bp hosszú szakaszon mutatott közel 100 %-os homológiát az általam megszekvenált DNS-sel. Ez annak tulajdonítható, hogy a két előbb említett, adatbázisban talált DNS szakasz csak az adott hosszúságú szakaszon fedte a klónozott DNS fragmentet (lásd 12. ábra). A kozmid c27 a klónozott DNS szakasz P-47-es primerrel megszekvenált végével, míg a cosmid c28F2 a P-40-es primerrel megszekvenált végével mutatott átfedést. A harmadik, 24.752 bp hosszú kozmid 1228 viszont teljes hosszúságban (4477 bp) tartalmazta a C7-es plazmidban klónozott genomiális DNS szakaszt (lásd 12. ábra). A homológia alapján talált kozmidok kromoszómán való elhelyezkedéseiből megállapítható, hogy a C7 klónban klónozott DNS szakasz közel a centromérához a II. kromoszóma bal "karján" található.



**12. ábra.** A pUR18N vektorban klónozott és megszekvenált genomiális DNS. A DNS szakaszon belül két ORF-et sikerült találni: *sua1* gén-késsel jelölve, 324 bp hosszú DNS szakasz-pirossal jelölve. Az *sua1* gént az *Sph*I restrikciós enzimmal szubklónoztam, amelynek az ORF előtt (-497 bp) és után (+377 bp) is van hasító helye. Az ábra alatt a szekvenálásnál használt primerek (P illetve ST) sorrendje látható. A nyilak a szekvenálás irányát jelölik. A primerek alatt a génbankban talált, az általam megszekvenált DNS szakasszal átfedő kozmidok vannak feltüntetve. Alattuk zárójelben az átfedés hossza található.

## 5.8 A klónozott DNS szakasz analízise

A FramePlot 2.3.2. program segítségével a klónozott genomiális fragmenten belül (Open Reading Frame-eket=ORF, "Nyitott leolvasási keretek") kerestem. 300 bp-nál hosszabb ORF-et vettem figyelembe, amelyekből kettőt sikerült találni:

i., 324 bp (107 as) hosszúságú ORF (3.826-4.137 bp), amely aminosav szinten 57 %-os azonosságot mutatott a *Saccharomyces cerevisiae* XVI. kromoszómáján található Lpg10p fehérjét kódoló génnel (elérhetőségi száma az adatbankban U43281, lokusz YPL098C). A 113 aminosavból álló Lpg10p fehérje pontos funkciója egyelőre nem ismert. Feltehetőleg a két transzmembrán régiójával (21-43, 58-77) a sejtmembránhoz kötődik és a szignál transzdukcióban játszik szerepet.

ii., 1473 bp (490 as) hosszúságú ORF (1.627-3.099 bp). Ez az ORF nukleotid szinten 60 %-os azonosságot mutatott a *Saccharomyces cerevisiae*-nél leírt *MET3* (YJR010W) génnel. A *MET3* gén kódolja az ATP-szulfuriláz enzimet, amely a sejtbe jutó  $\text{SO}_4^{2-}$  aniont aktiválja adenozin-foszfoszfátá. A *S. cerevisiae* *MET3* génjén kívül nukleotid szinten a *Candida albicans*, a *Penicillium chrysogenum* és az *Aspergillus terreus* gombáknál, illetve az eukarióta mikroorganizmusokon kívül a baktériális és a humán ATP-szulfuriláz génnel is nagy homológiát mutatott (lásd 7. táblázat, 13. ábra, 14. ábra).

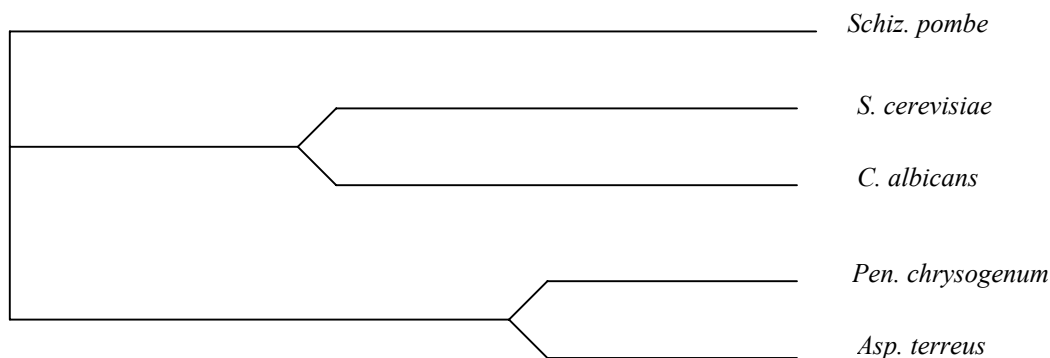
A kapott eredményekből nagy valószínűséggel megállapítható, hogy a 1473 bp hosszú ORF a *Schiz. pombe*-nél az ATP-szulfuriláz enzimet kódolja. Az így klónozott gént *sua1*-nek neveztük el.

Faj	ATP-szulfuriláz gén homológia %	ATP-szulfuriláz enzim homológia %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60 %	56 %
<i>Candida albicans</i>	59 %	53 %
<i>Penicillium chrysogenum</i>	61 %	52 %
<i>Aspergillus terreus</i>	61 %	51 %

7. táblázat. *Schiz. pombe* ATP-szulfuriláz génjének, illetve enzimének %-ban kifejezett homológiája más mikroorganizmusokkal.

<i>Schiz. pombe</i>	(183)	RNNWNRVVA <b>FQTRNPMHRAH</b> RELTVRAAKQHGAR-----VLIHPVVG <b>MTKPGDIDHFT</b> RVRVYEAIL
<i>S. cerevisiae</i>	(185)	SRQWDRVVA <b>FQTRNPMHRAH</b> RELTVRAAREANAK-----VLIHPVVG <b>LTKPGDIDHHT</b> RVRVYQEII
<i>Can. albicans</i>	(194)	GWAQENIV <b>FQTRNPMHRAH</b> RELTI <b>RAAQDI</b> ----GDKAHIL <b>IHPVVG</b> LTKPGDIDHHT <b>RVKVKQIL</b>
<i>Pen. chrysogenum</i>	(187)	KLGWSRVVA <b>FQTRNPMHRAH</b> RELTVRAARSQAN-----VLIHPVVG <b>LTKPGDIDHFT</b> RVRAYQALL
<i>Asp. terreus</i>	(180)	KLGWTRVVA <b>FQTRNPMHRAH</b> RELTVRAARARQAN-----VLIHPVVG <b>LTKPGDIDHFT</b> RVRAYQALL
<i>Bacillus sub.</i>	(175)	EKGWETIV <b>GFQTRNPMHRAH</b> -EYIQKTALETVDG-----LL <b>HPVVG</b> ETKS <b>DDI</b> PADV <b>RMESYQVLL</b>
<i>Mus musculus</i>	(173)	DMNADAV <b>FQTRNPMHRAH</b> ALLMQD <b>THKQL</b> LLERGYRRPV <b>LLHPVVG</b> TK <b>DDVPLMWRM</b> KQHAAVL
<i>Schiz. pombe</i>	(254)	QRY--PKGS <b>AKLSLLPLAMRMAGPREAL</b> WHAI <b>IRKNYGASHFIVGRDHAG</b> PGKNSQGEDFYGPYDAQY
<i>S. cerevisiae</i>	(256)	KRY--PNGIA <b>FLSLLPLAMRMSGDREAV</b> WHAI <b>IRKNYGASHFIVGRDHAG</b> PGKNSKGVDFYGPYDAQE
<i>C. albicans</i>	(269)	TKF--PDGL <b>ATLSLLPLAMRMGGDREAL</b> WHAL <b>IRTNYGVDHFIVGRDHAG</b> PGKNSQGVDFYGPYDAQE
<i>Pen. chrysogenum</i>	(258)	PRY--PNGMA <b>VLGLLGLAMRMGGPREAI</b> WHAI <b>IRKNHGATHFIVGRDHAG</b> PGSNSKGEDFYGPYDAQH
<i>Asp. terreus</i>	(251)	PRY--PNGMA <b>VLGLLPLAMRMGGPREAI</b> WHAI <b>IRKNHGATHFIVGRDHAG</b> PGKNSKGE <b>E</b> FYGPYDAQH
<i>Bacillus sub.</i>	(236)	DHYY-PKDR <b>VFLGVFLAAMRYAGPREAI</b> FHAL <b>VRKNYGCTHFIVGRDHAG</b> VG-----DYYGT <b>YEAQE</b>
<i>Mus musculus</i>	(241)	EEGILDPETT <b>VVAIFPSPMYAGPTEVQ</b> WH <b>CRARMVAGANFYIVGRDP</b> AGM <b>PHPETGKDL</b> YEP <b>THGAK</b>

**13. ábra.** *Schizosaccharomyces pombe* (AF421374), *Saccharomyces cerevisiae* (X60157), *Candida albicans* (AF164103), *Penicillium chrysogenum* (U07353), *Aspergillus terreus* (AF123267), *Bacillus subtilis* (AJ000974) és *Mus musculus* (U34883) élőlényeknél leírt ATP-szulfuriláz enzim konzervatív régiójának aminosav sorrendjének összehasonlítása. Az azonos szekvenciák pirossal, a hasonló szekvenciák késsel vannak kiemelve. A konzervatív szekvenciák kerettel vannak kijelölve.



**14. ábra.** A *Schiz. pombe*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Pen. chrysogenum* és *Asp. terreus* ATP-szulfuriláz enzimjeinek aminosav szekvenciája szerint alkotott dendrogram ([http://decypher.stanford.edu/index\\_by\\_algo.htm](http://decypher.stanford.edu/index_by_algo.htm)). Amint az ábrán látható, a két penészgomba (*Pen. chrysogenum*, *Asp. terreus*) illetve két élesztőgomba (*S. cerevisiae*, *C. albicans*) külön-külön csoportot alkotnak, míg a *Schiz. pombe* egy külön ágat képvisel.

## 5.9 Az *sua1* gén analízise

Az *sua1* gén ORF szekvenciája egy 490 aminosavból álló fehérje kódolására képes (lásd 16. ábra). A gén kezdő kodonja a metionint kódoló ATG, STOP kodonja pedig a TAA. A gén intront nem tartalmaz. Az enzimből található kodonok gyakorisága a 15. ábrában található. A 61. aminosavat kódoló kodonok közül 6 kodon nem található meg az *sua1* génben.

TTT	Phe : 8	TCT	Ser : 11	TTA	Tyr : 8	TGT	Cys : 0
TTC	Phe : 10	TCC	Ser : 3	TAC	Tyr : 12	TGC	Cys : 1
TTA	Leu : 8	TCA	Ser : 4	TAA	Stop: 1	TGA	Stop: 0
TTG	Leu : 14	TCG	Ser : 2	TAG	Stop: 0	TGG	Trp : 4
CTT	Leu : 15	CCT	Pro : 19	CAT	His : 6	CGT	Arg : 20
CTC	Leu : 7	CCC	Pro : 8	CAU	His : 5	CGC	Arg : 12
CTA	Leu : 2	CCA	Pro : 4	CAA	Gln : 16	CGA	Arg : 0
CTG	Leu : 3	CCG	Pro : 0	CAG	Gln : 6	CGG	Arg : 0
ATT	Ile : 12	ACT	Thr : 12	AAT	Asn : 7	AGT	Ser : 3
ATC	Ile : 11	ACC	Thr : 10	AAC	Asn : 12	AGC	Ser : 3
ATA	Ile : 0	ACA	Thr : 0	AAA	Lys : 9	AGA	Arg : 2
ATG	Met : 8	ACG	Thr : 0	AAG	Lys : 13	AGG	Arg : 1
GTT	Val : 20	GCT	Ala : 27	GAT	Asp : 22	GGT	Gly : 22
GTC	Val : 13	GCC	Ala : 17	GAC	Asp : 9	GGC	Gly : 3
GTA	Val : 5	GCA	Ala : 2	GAA	Glu : 14	GGA	Gly : 4
GTG	Val : 5	GCG	Ala : 1	GAG	Glu : 14	GGG	Gly : 1

**15. ábra.** Az *sua1* génben található kodonok gyakorisága.

Az *sua1* génben a kezdő ATG kodon után további hét ATG kodon található: 162, 591, 672, 780, 786, 981 és 984 bázispárra az első start kodontól. Az első kivételével a többi ATG triplet a konzervatív régiókban vagy azon túl található a génben, ezért feltehetőleg nem a start, hanem a metionin kodon szerepét töltik be. Kozák (1981) illetve Stiles és mtsai (1981) leírták, hogy a transzkripció iniciálása után, amivel jelen esetben az első ATG kodon előtti régió jellemezhető, nagy valószínűséggel az első ATG triplet tölti be a start kodon szerepét. Ezenkívül Ammerer és mtsi (1981) szintén publikálták, hogy az élesztő gének többségénél az ATG kodont megelőző harmadik pozícióban adenin, a struktúr gén 6. pozíciójában pedig timin található. Az ATG tripletek közül e két kritériumnak csak az 1. pozícióban lévő start kodon felel meg, így nagy valószínűséggel megállapítható, hogy ezzel az ATG kodonnal kezdődik az *sua1* gén translációja. Az *sua1* génben a másik kéntartalmú aminosavat (cisztein) kódoló triplet mindössze egyszer fordul elő.

Cherest és mtsi (1987) a *S. cerevisiae* *MET3*, *MET2* és *MET25* génjeinek "upstream" régiójában lévő szakaszokat összevetve igyekeztek olyan szekvenciát vagy szekvenciákat keresni, amelyek a gének regulációjában játszhatnak szerepet. A szekvenciák összehasonlítása után megállapították, hogy mindhárom metionin szintézisben szerepet játszó gén előtt (a -100 és -300 bp között) található egy vagy két, 9 nukleotidból álló szekvencia (AA<sup>C</sup>/<sub>G</sub>T<sup>T</sup>/<sub>A</sub>A<sup>G</sup>/<sub>C</sub>T<sup>C</sup>/<sub>T</sub>). Az *sua1* gén előtt -239 távolságra szintén található egy ugyanilyen 9 nukleotidból álló szekvencia (AACTACTT), amely feltehetőleg a regulációban játszik szerepet. A struktúr gén előtt, a promoter régióban 3 potenciális ATA szekvenciát tartalmazó TATA boxot találtam (lásd 16. ábra): -42 ATATA, -60 TATTA, -198 TAAT. Az élesztőgombáknál a gének átírásában szereppel bíró szekvenciák elrendeződése az promóter részében a következő: szabályzó szekvenciák-TATA box-START kodon. Ezt figyelembe véve az *sua1* gén előtt talált három potenciális TATA boxok közül csak a -42 és -60 távolságra találhatóak tölthetők be a TATA box szerepét.

Az *sua1* gén 3' végén egy adeninben (A) és timinben (T) gazdag szakasz található: a gént követő 210 nukleotid hosszú szakasz A+T tartalma 73 %. A gén STOP kodonja (TAA) után 17 bp-ra egy 11-szer ismétlődő AT szakasz található. Hasonló ismétlődést írtak le a *Saccharomyces cerevisiae* ATP-szulfuriláz enzimét kódoló *MET3* gén előtt is. A *S. cerevisiae*-nél azonban az AT gazdag szakasz a struktúr gén előtt található és az AT bázispár 17-szer ismétlődik (Cherest és mtsi, 1987). Az *sua1* gént követő szakaszban kétszer található meg az AATAAA szekvencia (+1558, +1638)(lásd 16. ábra), amely az eukariótáknál a poliadenilációs szignálért felelős. A génhez való közelsége miatt feltehetőleg az első AATAAA szakasz (+1558) tölti be a poliadenilációs szignál szerepét. Zaret és Sherman (1982) publikálták, hogy az élesztőgombáknál feltehetőleg a gént követően a STOP kodon utáni „...1-40(T gazdag)...TAC...TA(T)GT...AT gazdag TTT” szekvencia a transzkripció terminációjában játszik szerepet, melyet a *S. cerevisiae* *MET3* génjénél is már leírtak (Cherest és mtsi, 1987). Hasonló szekvencia található az *sua1* génben is: TAA(STOP kodon)...1-37 bp (89 %AT, 45 % T)...TAC...22 bp...TATGT...11bp...AT...1 bp...AAA.

A *Schiz. pombe* genom szekvenciája alapján (Wood és mtsi, 2002) sikerült az 1473 bp hosszú ORF-et megtalálni a II. kromozómán a 1.491.184-1.492.656 bázispárok között. Szekvenciája alapján az ATP-szulfuriláz génnek tételezték fel, azonban működéséről, szabályozottságáról eddig még nem jelent meg közlemény. A funkcionálisan is ismert gének közül az *sua1*-et egyik oldalról a meiotikus osztódást szabályozó fehérjét kódoló *meu25* gén, míg másik oldalról a peptidil-prolil cisz-transz izomerázt kódoló *cdc2* gén fogja közre.

Az *sua1* gén kódolta fehérjének a nagysága 54,7 kDa, töltése 3,5 és az izoelektromos pontja pedig pH=7.1.



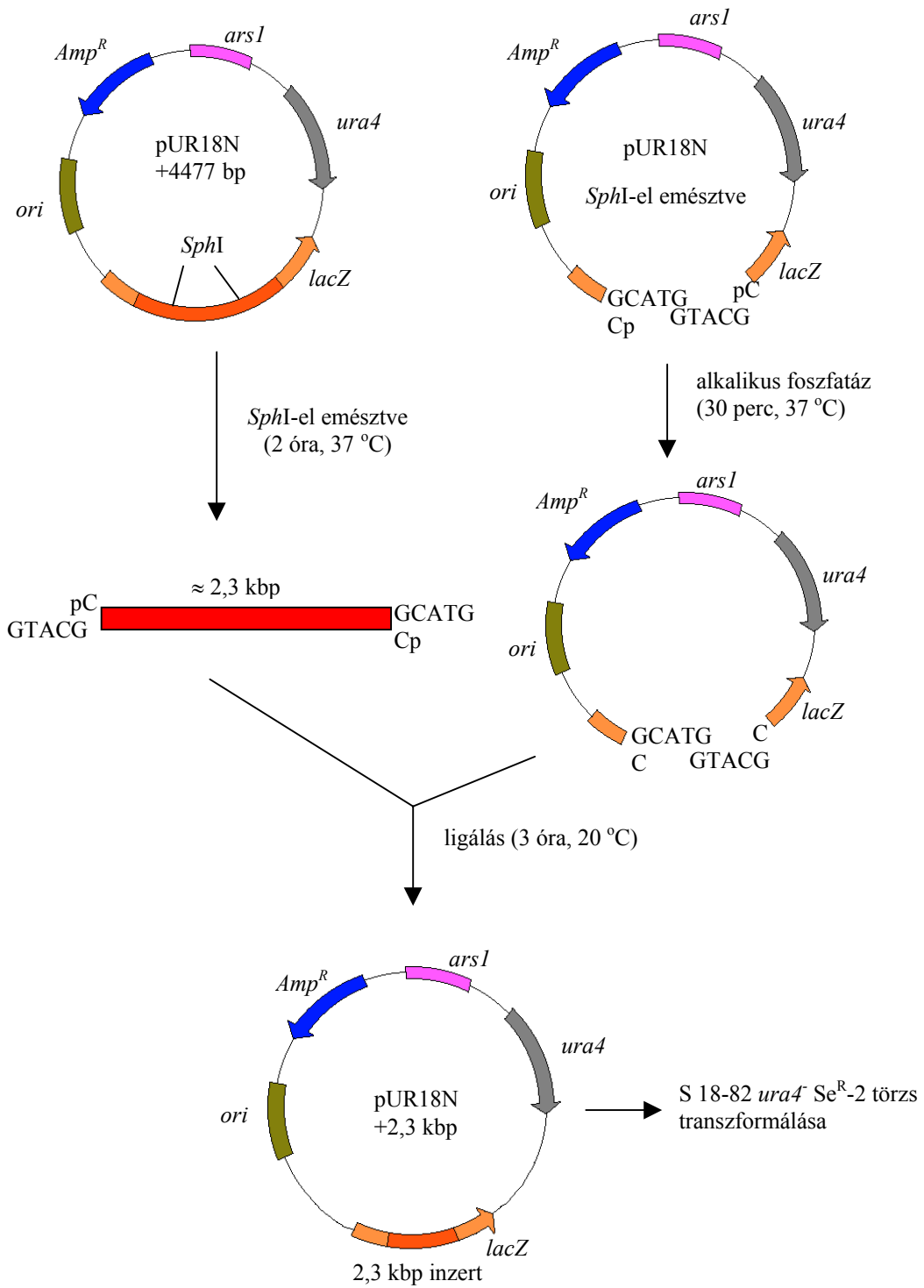
<sup>-316</sup>CGAAGAGTTTTCTCAGTAGAATGGATGCAAGTTGTATGTGTTTTGGAGTGGACGAATGAAACATGCTGAAAAAATAAA  
<sup>-237</sup>CTTACTTAAGATTATCATTAAAGCGAGCGAGTAAAAATGCTAATTTGCGCAAGTTATGTTGTCACAAGTTTTGTGACTACT  
<sup>-158</sup>CAGTAAAAATTTGGGGAAAAATTCATTCTCCGCTAAATGGAATTCGCGGAGAAATGCCAAATGCGGACGCTCTATTGT  
<sup>-79</sup>CCCGCCTACGGTGGATTCTATTAGTCAGTACGTAGATATAAATAACAAGCAGGTCCTTTACGATTTGGGGTGTCAA  
<sup>1</sup>ATG ACT AAA GCT TTG TTG AAA GAT CTT AAC GCC AGA GAT GCT CCT CTG AGA GAA CAA CTG  
M T K A L L K D L N A R D A P L R E Q L  
<sup>61</sup>GAA CAG GAG GCT ACT AGC CTT CCC AAA ATT GTA CTA TCG GAA CGT CAG TTT TGC GAT GTG  
E Q E A T S L P K I V L S E R Q F C D V  
<sup>121</sup>GAA CTC ATT TTG AAC GGA GGT TTC AGT CCA TTA GAC GGA TTC ATG AAC CAA AAG GAT TAT  
E L I L N G G F S P L D G F M N Q K D Y  
<sup>181</sup>TTG AAT GTC GTC GAG AAT TTG CGT CTC AGC ACT GGC GAG GTC TTT CCC ATC CCT ATC ACC  
L N V V E N L R L S T G E V F P I P I T  
<sup>241</sup>TTG GAC CTC AAT GAA TCG CAG GCC GAT TCT TTG AAG GCC GGT GAT CGT GTT GCA TTA TTA  
L D L N E S Q A D S L K A G D R V A L L  
<sup>301</sup>GAT CCT AGG GAT GGG CAA ACT GTT ATT GCC ATT TTG ACT GTT GAG GAC AAG TAT ACC CCA  
D P R D G Q T V I A I L T V E D K Y T P  
<sup>361</sup>GAT AAG GCG AAC GAA GCT GAA AAG GTA TTT GGT GCT AAT GAT CGC GCC CAC CCT GCC GTC  
D K A N E A E K V F G A N D R A H P L A  
<sup>421</sup>GAC TAC TTG TTT GGT CGT GCT GGA AAT GTG TAT GTT GGT GGT AAA CTT CAA GCC GTT ACT  
D Y L F G R A G N V Y V G G K L Q A V T  
<sup>481</sup>CCT ATT CGC CAT TTC GAT TTC GTA GAG TAC CGC TAC TCA CCT GCT CAA CTT CGC TCT GAC  
P I R H F D F V E Y R Y S P A Q L R S D  
<sup>541</sup>TTC CAG CGT AAC AAC TGG AAT CGC GTC GTT GCT TTC CAA ACC CGT AAT CCC ATG CAT CGC  
F Q R N N W N R V V A F Q T R N P M H R  
<sup>601</sup>GCC CAT CGT GAG CTT ACC GTC CGT GCT GCT AAG CAA CAC GGT GCC CGT GTG CTC ATT CAC  
A H R E L T V R A A K Q H G A R V L I H  
<sup>661</sup>CCT GTC GTC GGT ATG ACC AAG CCT GGT GAT ATC GAT CAC TTC ACC CGT GTG CGT GTT TAC  
P V V G M T K P G D I D H F T R V R V Y  
<sup>721</sup>GAG GCT ATT CTC CAA CGC TAT CCT AAG GGT TCC GCC AAG CTC TCT CTT CTT CCC TTA GCC  
E A I L Q R Y P K G S A K L S L L A  
<sup>781</sup>ATG CGT ATG GCT GGT CCT CGT GAA GCT TTA TGG CAC GCC ATC ATT CGT AAG AAC TAC GGT  
M R M A G P R E A L W H A I I R K N Y G  
<sup>841</sup>GCT TCT CAT TTC ATC ATT GGT CGT GAT CAT GCT GGT CCT GGT AAG AAC AGT CAA GGC GAG  
A S H F I I G R D H A G P G K N S Q G E  
<sup>901</sup>GAT TTT TAT GGT CCT TAC GAT GCT CAG TAC CTT GTT GAA CAA TAC GCT CAG GAA ATC GGT  
D F Y G P Y D A Q Y L V E Q Y A Q E I G  
<sup>961</sup>ATC ACC ATT GTT CCT TTC CAA ATG ATG ACT TAC CTT CCT GAT GAG GAC ATC TAC AAG CCA  
I T I V P F M M T Y L P D E D I Y K P  
<sup>1021</sup>GTT GAC AAA GTC GAA CCC GGT ACC CGT ACT TTG AAC ATC AGT GGT ACT GAA CTT CGT CGC  
V D K V E P G T R T L N I S G T E L R R  
<sup>1081</sup>CGT CTT CGC GTC GGT GCC AAC ATC CCT GAG TGG TTC TCT TAT CCA GAG GTT GTC GCT ATT  
R L R V G A N I P E W F S Y P E V V A I  
<sup>1141</sup>TTA CGT CAA TCC TAT CCT CCC AAA TAC TCT CAA GGA TTT GTT TTG GCT GTT CCT GCC ACC  
L R Q S Y P P K Y S Q G F V L A V P A T  
<sup>1201</sup>TCC GAT AAA CTT CTC CCC AGC GCT CTA GTT TCA GCC TTG AAC GAG GAT GGT CGC CGC CAT  
S D K L L P S A L V S A L N E D G R R H  
<sup>1261</sup>GCT ACT CTT TTA CCT CGC TTA GAT GCT ATT TCA GTG TTT TAC GCC CAA GAA TTG CAA CGT  
V T L L P R L D A I S V F Y A Q E L Q R  
<sup>1321</sup>GCT GGT GCT GCC GTT GTT GTT TCT CTG GCT GAT GCT GAT GCA TCT GTT AAA GTA CCT GCT  
A G A A V V S L A D A D A S V K V P A  
<sup>1381</sup>GAG TGG ACT ACC GTA AAC ATC AAG CCC AAA GAC TCT GTT TCT GAG GTT ACT TTT GCT GTC  
E W T T V N I K P K D S V S E V T F A V  
<sup>1441</sup>CTT TCA CAA TTG TCT GAC GAA GGC TAT CTT TAA  
L S Q L S D E G Y L -  
<sup>1474</sup>AATAATGTTTTGTGACATATATATATATATATATATATACATATATCCATTTTTGTTCTTTTATGTTCTACTTGTCTATT  
<sup>1554</sup>AAATAATAAATAATTGCTGCAGGAATGACAACACTCCCTCATTAGAACTTTGCCATTTGTAGATGTAACATAAGAAATGCA  
<sup>1634</sup>ACTCAATTAATAATTCGCTAAGGACATGTTAGTAATTAATAGCGATAGGCTTCTTAATAACAAAAGGTAGGAAATCAAT  
<sup>1714</sup>CCGAAGCCGAGGGGAATTAATTTATATATATATGTCAGATATACATAGCAGACTTTAGCAATTGCAATACATGCCAATGCA  
<sup>1794</sup>ATGTTTTATTTAATTCAGAAGTCATTATAACGTTAAGCCTATGCTCTCACTTAACGCATGCCTGGATGTAATACATTGT

16. ábra. A klónozott ATP-szulfuriláz gén (*sua1*) nukleotid szekvenciája. Szaggatott vonallal a 11-szer ismétlődő AT szekvencia van aláhúzva. A kodonok alatt az adott aminosav kódja található.

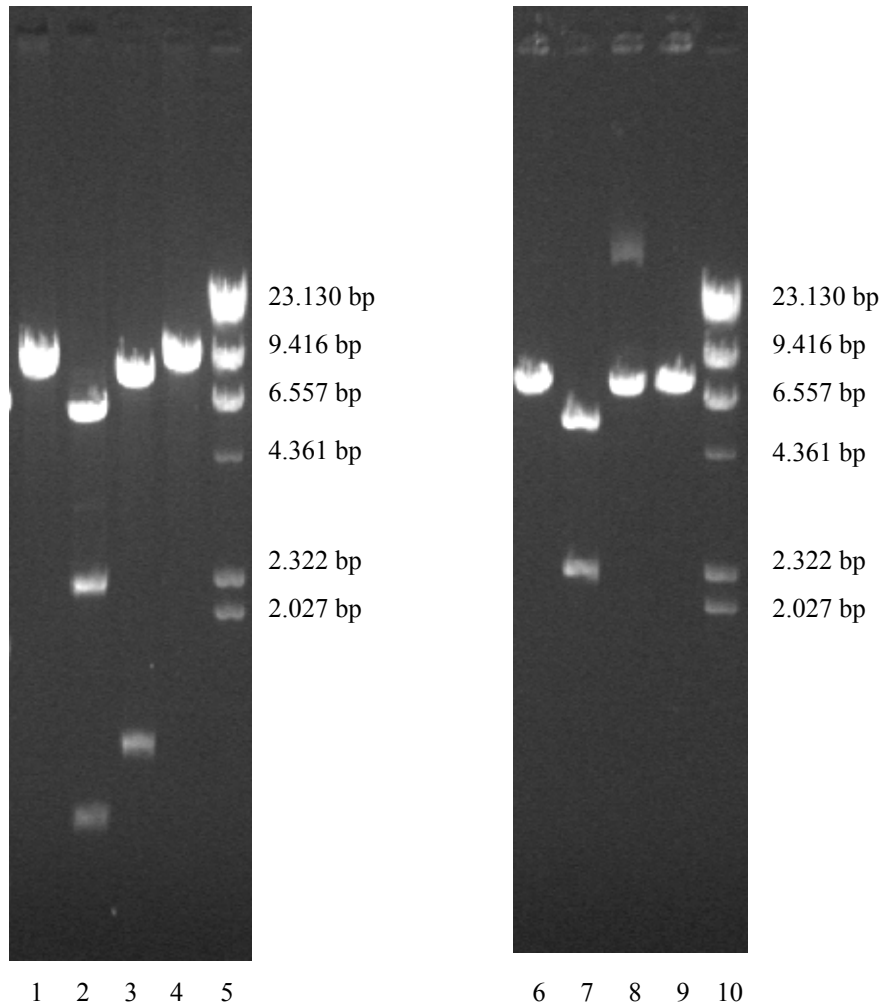
## 5.10 Az *sua1* gén szubklónoozása

A sikeres transzformáció, szekvenálás és analízis eredményeiből arra következtettem, hogy a két klónozott gén közül az 1473 bp hosszú, ATP-szulfuriláz enzimet kódoló *sua1* gén felelős a szulfátot nem hasznosító/szelenát-rezisztens fenotípusért. Ennek bizonyítására restriktív enzim segítségével a C7-es plazmidból kivágtam az ATP-szulfuriláz enzimet kódoló gén, visszaklónoztam a pUR18N vektorba és ismét szelenát-rezisztens sejteket transzformáltam. Megvizsgáltam, hogy az adott gén képes-e komplementálni a szulfátot nem hasznosító mutánst.

Első lépésként *SphI*-es restriktív enzimmel kivágtam a C7-es plazmidból az *sua1* gént úgy, hogy a kivágott szakasz nem tartalmazta a rövidebb, 303 bp hosszú ORF-et. A *SphI*-es restriktív enzim az *sua1* gén előtt 497 bp-ral, a gén után pedig 1850 bp-ral vágta el a klónozott genomialis DNS szakaszt (lásd 16. ábra), így a kivágásra kerülő DNS szakasz hossza kb. 2,3 kbp volt. A pUR18N plazmidban található "Multi Cloning Site" régióban az *SphI* restriktív enzimnek van hasító helye, így ugyanazzal a restriktív enzimmel megemésztettem a vektort is. Mivel mindkét megemésztett DNS kohéziós végei azonosak voltak, így könnyen tudtam ligáltatni az adott DNS szakaszokat. A ligálást követően az S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R</sup>-2 törzset transzformáltam a rekombináns plazmiddal (lásd 17. ábra), és a transzformált sejteket szulfát tartalmú minimál táptalajra szélesztettem ki. Pár napi inkubálást követően a szelektív táptalaj felszínéről pozitív klónokat izoláltam ( $10^2$  transzformáns/ $\mu$ g DNS), majd a plazmidot *E. coli*-val visszaizolálva megállapítottam a plazmid nagyságát (lásd 18. ábra). A 2,3 bp hosszú fragmentet tartalmazó plazmidot ugyanazzal az 5 restriktív enzimmel emésztettem meg (*NotI*, *SphI*, *PstI*, *BamHI*), mint a C7-es plazmidot. A várakozásnak megfelelően a *SphI* és a *PstI* esetében a 2,3 bp hosszú fragmentet tartalmazó plazmidnál egy DNS sávval kevesebbet kaptam, mint a C7-nél. Amint az 20. ábrán is látható, a visszaizolált plazmid nagysága kb. 8 kbp (*NotI*, *PstI*, *BamHI* esetében), ami megegyezik a pUR18N vektor (kb. 5,5 kbp) és a 2,3 kbp klónozott DNS szakasz méretének összegével.



17. ábra. Az *suaI* gén szubklónozásának menete pUR18N vektorba.



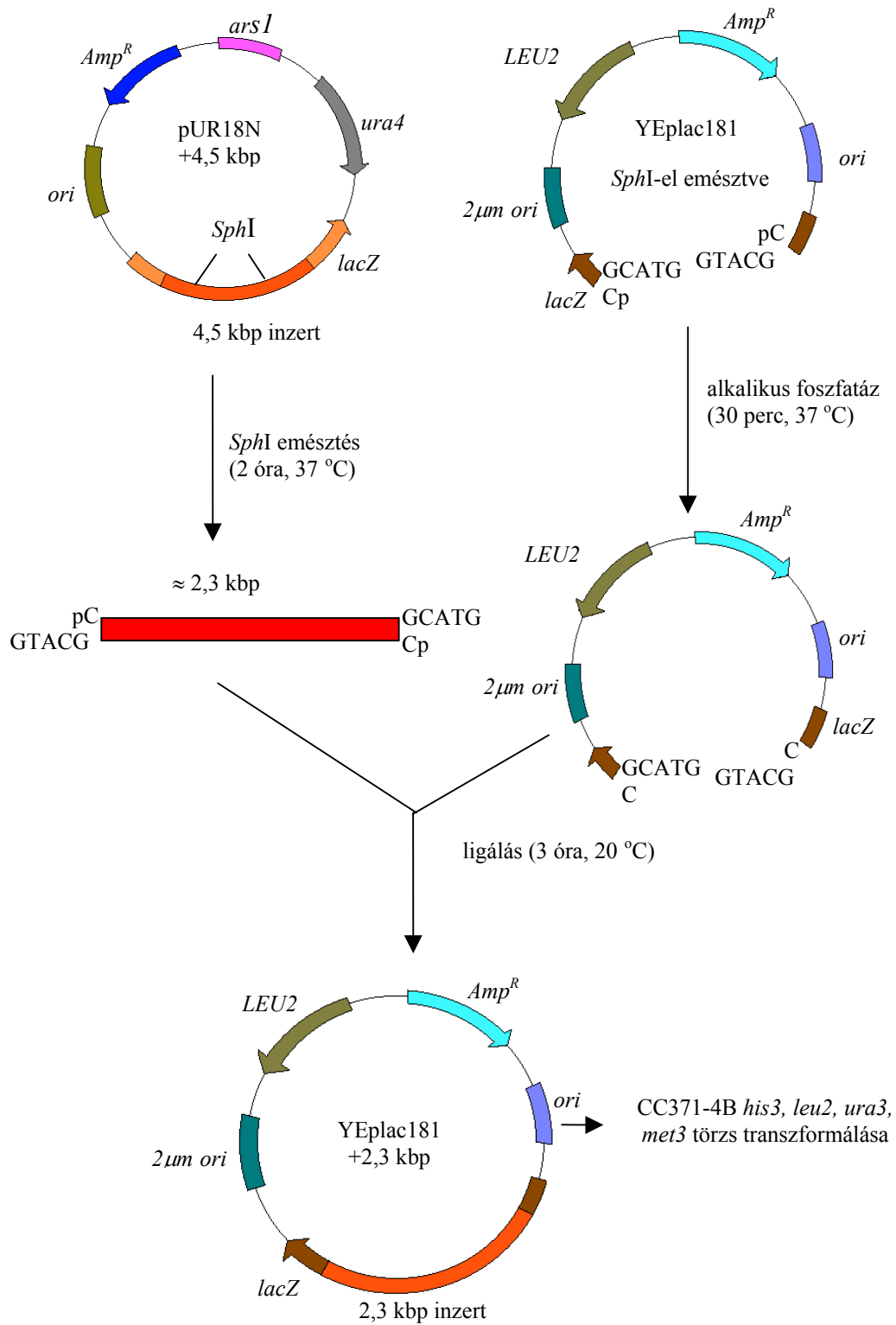
**18. ábra.** A *NotI*, *SphI*, *PstI* és *BamHI* restriktív enzimekkel megemésztett C7-es (A) és a szubklónozás után kapott plazmid (B) elektroforézis képe. A: C7-es plazmid *NotI*(1), *SphI*(2), *PstI*(3) és *BamHI*(4) restriktív enzimekkel megemésztve. B: szubklónozott plazmid *NotI*(6), *SphI*(7), *PstI*(8) és *BamHI*(9) restriktív enzimekkel megemésztve. 5, 10 oszlop:  $\lambda$  DNS *Hind*III restriktív enzimmel megemésztve.

## 5.11 Az *sua1* gén klónozása *S. cerevisiae* élesztőgombába

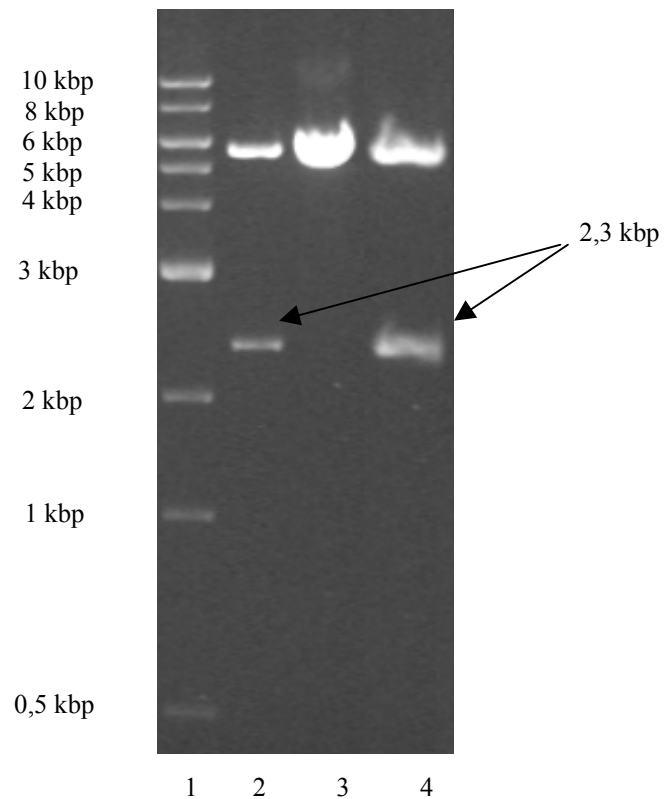
Amint az 14. ábrán is látható, a különböző élőlényeknél található ATP-szulfuriláz enzimet kódoló gének nagy hasonlóságot mutatnak. Ezt a tényt támasztja alá, hogy a burgonya és az *Arabidopsis thaliana* növények ATP-szulfuriláz génjeit úgy sikerült izolálni, hogy a *S. cerevisiae met3* mutáns törzsét transzformálták az adott növény génbankjával, majd a pozitív telepekből izolálták a növényi ATP-szulfuriláz gént (Leustek és mtsi, 1994; Klonus és mtsi, 1994).

Egy franciaországi laboratóriumból sikerült beszerezni egy *S. cerevisiae met3* mutáns törzset (CC371-4B Mata *his3, leu2, ura3, met3*; Cherest és mtsi, 1987), melyben megpróbáltam klónozni az általam izolált *sua1* gént. Kíváncsi voltam, hogy az *sua1* gén képes-e komplementálni a *met3* mutáns allélt. A klónozáshoz egy *S. cerevisiae*-nél használatos, *LEU2* gént hordozó, multikópiás plazmidot használtam (YEplac181, lásd 9/B. ábra). A vektor a MCS (Multi Cloning Site) klónozó részében hordozott egy *SphI* restrikciós helyet, így az *sua1 SphI* restrikciós enzimmal történő kivágása, illetve a YEplac181 vektor *SphI* enzimmal való emésztése és alkalikus foszfatázzal történő kezelése után a vektort a kivágott *sua1* génnel ligáltattam.

A ligálás után a ligátummal transzformáltam a *S. cerevisiae* CC371-4B mutáns törzsét. A transzformánsok a szelektív táptalaj felszínén 5-7. napi inkubálás után jelentek meg kis gyakorisággal. A pozitív telepekből *E. coli*-ban feldúsítottam a visszaizolált plazmidot, majd újra transzformáltam a *met3* mutáns törzset. Ebben az esetben lényegesen nagyobb gyakorisággal. Ez azt mutatja, hogy a *Schiz. pombe* ATP-szulfuriláz enzimét kódoló *sua1* génje képes komplementálni a *S. cerevisiae met3* mutációját, valamint hogy a *Schiz. pombe* promoter és transzkripció szignálok képesek ellátni szerepüket *S. cerevisiae*-ben is. A transzformánsokból visszaizolált plazmid *SphI* restrikciós enzimmal megemésztve 2 fragmentumot adott (20. ábra), amelyek megfeleltek a vektor és az inzert méretének.



19. ábra. Az *sua1* gén *S. cerevisiae* élesztőgombában való klónozásának menete



**20. ábra.** A pUR18N plazmid, a pUR18N+2,3 kbp fragment és a pYEplac181+2,3 kbp fragment *SphI* restrikciós enzimmel emésztett képe. 1. oszlop: 1 kbp DNS marker (BioLabs); 2. oszlop: pUR18N+2,3 kbp fragment *SphI* restrikciós enzimmel emésztve; 3. oszlop: pUR18N plazmid *SphI* restrikciós enzimmel emésztve; 4. oszlop pYEplac181+2,3 kbp fragment *SphI* restrikciós enzimmel emésztve.

## 5.12 Az *sua1* gén egyedüli szelekciós markerként való alkalmazása

A 2,3 kbp hosszú DNS szakaszt tartalmazó pUR18N plazmidot különböző, nem izogenikus (B-579  $Se^R$ -2) és izogenikus szelenát-rezisztens *Schiz. pombe* törzsekbe (0-82  $ade5^-$   $Se^R$ -2, 0-121 *trp1 arg1*  $Se^R$ -2) transzformáltam. A törzsek csak az *sua1* mutációt hordozták (pl. nem tartalmaztak *ura4* mutációt, mint az S 18-82 *ura4*  $Se^R$ -2 törzs esetében). Transzformáció után a pozitív transzformánsok a B-579  $Se^R$ -2 esetében a minimál, illetve a 0-82  $ade5^-$   $Se^R$ -2 és 0-121 *trp1 arg1*  $Se^R$ -2 törzsek esetében kiegészített minimál táptalajokon 3-4 napi inkubálás után jelentek meg. Az eredmények azt bizonyítják, hogy az *sua1* mutációt hordozó transzformált törzs *sua1* génnel való komplementációja biztosítja a transzformánsok növekedését (lásd 8. táblázat). Az *sua1* génben sérült szelenát rezisztens mutánsok izolálása viszonylag egyszerű és hatékony eljárás, ezért az *sua1* gént, mint szelekciós markert tartalmazó vektorok gyakorlatilag bármely klónozó gazdánál alkalmazhatók, ugyanis mind a klónozó gazdaként használt ( $Se^R$ ) mutáns, mind pedig a transzformáns (szulfátra prototróf) pozitívan szelektálható.

Klónozó gazda	Transzformációs gyakoriság (transzformáns/ $\mu$ g pDNS)
B-579 $Se^R$ -2	$6 \cdot 10^2$
0-82 $ade5^-$ $Se^R$ -2	$7 \cdot 10^2$
0-121 <i>trp1 arg1</i> $Se^R$ -2	$1,3 \cdot 10^3$

**8. táblázat.** Különböző szelenát-rezisztens *Schiz. pombe* törzsek transzformálása után kapott transzformációs gyakoriságok.

## 5.13 Térképezett metionin auxotróf törzsek kénforrás hasznosításának vizsgálata

Néhány mikroorganizmusnál az ATP-szulfuriláz gén pontos funkciója és szekvenciája már ismert. A *S. cerevisiae*-nél, csakúgy mint a *Candida albicans*-nál a *MET3* gén kódolja az ATP-szulfuriláz enzimet. Kohli és mtsi (1977) *Schiz. pombe* metionin auxotróf törzseket izoláltak, amelyek közül az egyiket *met3*-nak nevezték el. Bár az így izolált metionin auxotróf törzsek elnevezése a komplementációs csoportoknak megfelelően történt, szerettem volna megbizonyosodni arról, hogy a *met3*, illetve a többi általuk izolált metionin auxotróf törzseknél (*met1*, *met2*, *met4* és *met5*) nem az ATP-szulfuriláz enzim sérült.

A Berni Egyetemről Kohli professzortól sikerült beszerezni az előbb említett öt *met* törzset. Először az öt metionin auxotróf törzseknél 0,4 mM nátrium-szelenátot tartalmazó táptalajon teszteltem szelenát érzékenységüket. A szelenátos táptalajon egyik mutáns törzs sem mutatott növekedést, ami arra utalt, hogy sem az ATP-szulfuriláz enzimből, sem pedig más, a szulfát redukciós út elején szerepet játszó génben nem sérültek. Utána az összes *met* törzset UV mutagén kezelésnek vettem alá, és szelenátos táptalajon (0,4 mM) szelenát-rezisztens telepeket izoláltam, majd leteszteltem a metionin auxotróf törzsek és az újjal izolált szelenát-rezisztens törzsek növekedését különböző kénforráson. A kénforrások közül, a várakozásnak megfelelően, a szulfátot egyik *met* mutáns sem volt képes hasznosítani, míg metioninen az összes törzs jól nőtt. A cisztein és a szulfít hasznosításban volt eltérés a törzsek között: ciszteinen és szulfiton a *met2* és a *met5* gyenge növekedést mutatott (lásd 9. táblázat).



Törzs	YEPD + 0,4 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	MM <sup>Cl</sup>				
		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	metionin	cisztein	metionin, cisztein
<i>met1</i>	-	-	-	+++	-	+++
<i>met1</i> Se <sup>R</sup>	+++	-	-	-	-	+++
<i>met2</i>	-	-	+	+++	+	+++
<i>met2</i> Se <sup>R</sup>	+++	-	+	-	+	+++
<i>met3</i>	-	-	-	+++	-	+++
<i>met3</i> Se <sup>R</sup>	+++	-	-	-	-	+++
<i>met4</i>	-	-	-	+++	-	+++
<i>met4</i> Se <sup>R</sup>	+++	-	-	-	-	+++
<i>met5</i>	-	-	+	+++	+	+++
<i>met5</i> Se <sup>R</sup>	+++	-	+	-	+	+++

**9. táblázat.** A *met1*-*met5* metionin auxotróf törzsek és azok szelenát-rezisztens telepeinek szelenát érzékenysége és kénforrás hasznosítása. A növekedés a 3. napi inkubálás után volt kiértékelve. A kénforrások koncentrációi: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:0,025 %; NaSO<sub>3</sub>:0,025 %; metionin, cisztein:0,1 µg/ml. Rövidítések: +++-nagyon jó növekedés, ++-jó növekedés, +-gyenge növekedés, --nincs növekedés.

Kohli és mtsi a mutánsoknál sérült géneket nem azonosították, viszont az egyes kromozómákra betérképezték, sőt a *met4* törzs kivételével a többi metionin auxotróf mutánsnál a sérült gén pontos helyét is meghatározták. Azóta ismertté vált a hasadó élesztőgomba teljes szekvenciája is (Wood és mtsi, 2002). A térképezés és a teljes genom szekvencia, illetve a kén hasznosítási kísérleteim eredményeit felhasználva az egyes *met* törzseknél megpróbáltam meghatározni az inaktivált géneket. Génbankkal való transzformálással is megpróbáltam meghatározni az egyes inaktivált géneket, de sajnos a transzformáció után egyik mutáns törzs esetében sem kaptam metionin prototróf telepeket. A Kohli és mtsi által elvégzett térképezés eredményeiből ismert volt, hogy az adott kromozómán mely gének található az adott metionin auxotrófiát okozó gén közelében. A *met* génekhez jobb illetve bal oldalról legközelebb álló gének pontos helyét megkerestem a *Schiz. pombe* genom szekvenciáján. E két eredményből, a térképezés és a *met* géneket közre fogó gének pontos elhelyezkedéséből következett, hogy a két szomszédos gén közötti genomialis DNS szakaszon található a metionin auxotrófiáért felelős gén. A keresett gént jobb illetve bal oldalról közrefogó gének közötti DNS szakaszon leellenőriztem az összes ORF-et, és a már más élőlényél leírt metionin hasznosításban résztvevő génnel nagy homológiát mutató ORF-eket kerestem.

A genetikai térképezés és a publikált genom szekvencia helyzetét összevetve az egyes mutánsoknál a következő géneket sikerült azonosítanom (lásd 10. táblázat, 21. ábra):

***met1*:** ennél a mutánsnál feltehetőleg a homocisztein-metiltranszferáz gén sérült. A gén az I. kromozómán helyezkedik el a 1.500.426-1.501.352 bázispárok között (a genom adatbankban az elérhetőségi száma: SPAC57A7.07c), és egy 308 aminosav hosszúságú fehérjét kódol.

***met2*:** ez a mutáns kénforrásként gyengén hasznosította a ciszteint és a szulfidot. A *met2* metionin auxotróf esetében két lehetséges gént találtam: az egyik az I. kromozómán a 1.422.194-1.423.381 bázis párok között helyezkedő cisztein-szintáz enzimet kódoló gén (SPAC3A12.17c), másik pedig a *met1* mutánstól eltérő homocisztein-metiltranszferáz (1.448.864-1.451.158, SPAC9.09) enzimet kódol. Az utóbbi nagy homológiát mutat a *S. cerevisiae* homocisztein-metiltranszferáz enzimet

kódoló *MET6* génnel (V. kromoszóma, YER091C). A kénhasznosítási kísérletek alapján megállapítottam, hogy a *met2* mutáns a homocisztein-metiltransferáz génben sérült.

***met3***: ezért a fenotípusért felelős gén a II. kromoszómán helyezkedik el és a cisztation- $\gamma$ -szintáz enzimet kódolja. A gén a 1.409.771-1.411.603 bázispárok között helyezkedik el (SPBC15D4.09c) és 610 aminosavból álló fehérjét kódol. Nagy homológiát mutat a *S. cerevisiae*-nél leírt *STR2* génnel (X. kromoszóma, SPBC15D4.09c), amely a cisztation- $\gamma$ -szintáz enzimet kódolja.

***met4***: ezt a gént nem térképezték be pontosan a II. kromoszómára, így a gén keresésénél a genom szekvencia eredményeit nem tudtam felhasználni. A kénhasznosítás eredményeiből az volt ismert, hogy a *met4* mutáns a ciszteint kénforrásként nem tudja hasznosítani, vagyis az inaktivált gén a cisztein és metionin közötti metabolikus úton szerepet játszó enzimet kódol. A potenciális gének közül kettő található a II. kromoszómán: a cisztation- $\gamma$ -szintáz és a homoszerin-O-acetiltransferáz (SPBC56F2.11) enzimeket kódoló gének. Mivel a *met3* nem allelikus a *met4* mutánsnal (a *met3* gén a cisztation- $\gamma$ -szintáz gént kódolja), így nagy valószínűséggel a *met4* esetében a homoszerin-O-acetiltransferáz gént inaktiválták. A gén a II. kromoszómán a 2.472.687-2.474.156 bp között helyezkedik el és nagy homológiát mutat a *S. cerevisiae* homoszerin-O-acetiltransferáz enzimét kódoló *MET2* génjével.

***met5***: ennél a mutánsnál nagy valószínűséggel a már leírt (Naula és mtsi, 2002) metil-tetrahidrofolát-reduktáz enzimet kódoló *met9* gént inaktiválták. A *S. cerevisiae*-nél ezt az enzimet a *MET13* gén kódolja.

Törzs elnevezése	Valószínű gén	Kromoszóma	Pontos hely (bp) a kromoszómán	Elérhetőségi száma az adatbankban	Gén nagysága (bp)
<i>met1</i>	homocisztein-metiltranszferáz "1"	I.	1.500.426-1.501.352	SPAC57A7.07c	927
<i>met2</i>	homocisztein-metiltranszferáz "2"	I.	1.448.864-1.451.158	SPAC9.09	2.295
<i>met3</i>	cisztation- $\gamma$ -szintáz	II.	1.409.771-1.411.603	SPBC15D4.09c	1.833
<i>met4</i>	homoszerin-O-acetiltranszferáz	II.	2.472.687-2.474.156	SPBC56F2.11	1.470
<i>met5</i>	metil-tetrahidrofolát-reduktáz ( <i>met9</i> )	I.	1.113.352-1.115.163	SPAC56F8.10	1.812

10. táblázat. Kohli és mtsi (1975) által leírt metionin auxotróf törzsek (*met1-met5*) inaktivált génjeinek jellemzése.



21. ábra. A *met1-met5* gének illetve az *sua1* gén elhelyezkedése az I. illetve a II. kromoszómán.

## 5.14 Szelenát-érzékeny illetve -rezisztens törzsek ATP-szulfuriláz aktivitásának mérése

Az ATP-szulfuriláz hiányának bizonyítására megmértem a vizsgált törzsek (0-82 *ade5<sup>-</sup>*, B-579) vad, illetve szelenát-rezisztens mutáns telepeinek ATP-szulfuriláz aktivitását. A mérési módszer alapja, hogy a szulfát aktiválása közben felszabadított foszforsav maradékok kénsav illetve L-aszkorbinsav jelenlétében az oldatot kékre színezik. Az kék elszíneződés 660 nm-en jól mérhető.

Megmértem az S 18-82 *ura4<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2*, a szülői 0-82 *ade5<sup>-</sup>* törzsek és az S 18-82/C7 pozitív klón ATP-szulfuriláz aktivitását is. Az eredményekből kitűnik (lásd 11. táblázat), hogy a vad típusú szelenát-érzékeny/szulfátot hasznosító törzsek kb. 10x nagyobb ATP-szulfuriláz aktivitást mutattak mint a szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító törzsek. A transzformáns enzimaktivitása hasonló volt, mint az izogenikus törzse.

Törzs	Specifikus enzimaktivitás (U/mg fehérje)
0-82 <i>ade5<sup>-</sup></i>	52,07±5,95
0-82 <i>ade5<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2</i>	5,03±4,53
S 18-82/C7	65,25±11,2
S 18-82 <i>ura4<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2</i>	6,3±4,1

**11. táblázat.** ATP-szulfuriláz enzimaktivitás a 0-82 *ade5<sup>-</sup>* és az S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* vad típusú (szelenát-érzékeny) és szelenát-rezisztens törzsek esetében. Az enzimaktivitás egység (U) definíciója: egy milliliter reakcióelegy által egy perc alatt felszabadított nmól foszforsav maradék (Pi).

## 5.15 Szelenát-rezisztens és szelenát-érzékeny törzsek kén-hidrogén termelése

A szulfátot a hasadó élesztőgomba a szulfát redukciós út során szulfidá (S<sup>-</sup>) redukálja. Szulfid túltermelés esetén a szulfid kén-hidrogén formájában távozik a sejtből, vagy beépül különböző, esetenként aromavegyületeként szereplő másodlagos anyagcseretermékekbe. Ha azonban a szulfát redukciós út valamely enzimét inaktíváljuk, a kén-hidrogén termelés mértéke csökkenhet vagy megszűnik. Ebből következik, hogy az ATP-szulfuriláz kódoló gén inaktíválásának a kén-hidrogén termelés csökkentéséhez vagy elvesztéséhez vezethet.

Jiránek és mtsi (1995) által leírt módszerrel megmértem két *Schiz. pombe* törzs (0-82 *ade5<sup>-</sup>*, B-579) szelenát-érzékeny, illetve -rezisztens törzseinek kén-hidrogén termelését. A mérési módszer alsó érzékenységi határa 6 ng H<sub>2</sub>S/szárazanyag volt. Először YEPD tápvelesbe oltottam be a törzseket, majd 24 óra után a Módszereknél leírtak szerint megmértem a törzsek kén-hidrogén termelését. Kontrollként be nem oltott YEPD tápveles szolgált. A 12. táblázatból kitűnik, hogy a szelenát-rezisztens törzsek nem termeltek kimutatható mennyiségben kén-hidrogént, míg a szelenát-érzékeny törzsek erős kén-hidrogén termelőknek bizonyultak. A két vizsgált törzs közül a 0-82 *ade5<sup>-</sup>* nagyobb mennyiségben termelt kén-hidrogént, mint a B-579 törzs. Ennek valószínű magyarázata, hogy az utóbbi törzs egy erősen kénezett mustból lett izolálva, ami összefüggésben lehetett egy csökkent S-metabolizmussal is.

A tápközegben lévő különböző szerves kénvegyületek represszálhatják a sejt szulfát metabolikus útjában szerepet játszó enzimek expresszióját, jelenlétük a tápközegben a vad típusú, szelenát-érzékeny törzs kén-hidrogén termelésének a csökkenését eredményezhetik. Ez alól kivétel

a metionin, amely jelenléte nem represszálja a szulfát asszimilációs útban szerepet játszó gének expresszióját (Brzywczy és Paszewski, 1994).

Ebből kifolyólag megmértem a 0-82 *ade5<sup>-</sup>* törzs szelenát-rezisztens és érzékeny törzseinek kén-hidrogén termelését cisztein tartalmú táplevesben. A YEPD táplevesbe különböző mennyiségű ciszteint (100 illetve 50 µg/ml) adtam. Ahogy az 13. táblázatból is kitűnik 50 µg/ml cisztein hozzáadása után a szelenát-érzékeny törzs kén-hidrogén termelése a felére csökkent, sőt 100 µg/ml cisztein hozzáadása után a szelenát-érzékeny törzs a szelenát-rezisztens törzshöz hasonlóan nem termelt kimutatható mennyiségű kén-hidrogént. A szelenát-rezisztens törzs kén-hidrogén termelése mindkét esetben az alsó mérési határ alá esett.

Törzs	Kén-hidrogén mennyisége	
	ng H <sub>2</sub> S/mg szárazanyag	ng H <sub>2</sub> S/ml tápleves
0-82 <i>ade5<sup>-</sup></i>	513,3±50,3	547,42±53,65
0-82 <i>ade5<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2</i>	<6	<6,4
B-579	335,7±44,1	358,08±47,04
B-579 <i>Se<sup>R</sup>-2</i>	<6	<6,4
Kontroll (YEPD)	<6	<6,4

**12. táblázat.** Szelenát-érzékeny illetve -rezisztens *Schiz. pombe* élesztőgomba törzsek kén-hidrogén termelése.

Táptalaj	Kén-hidrogén mennyisége (ng H <sub>2</sub> S/mg szárazanyag)		
	0-82 <i>ade5<sup>-</sup></i>	0-82 <i>ade5<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2</i>	Kontroll (beoltás nélkül)
YEPD	513,3±50,3	<6	<6
YEPD+0,005% cisztein	253,3±26,5	<6	<6
YEPD+0,01% cisztein	<6	<6	<6

**13. táblázat.** *Schiz. pombe* 0-82 *ade5<sup>-</sup>* és 0-82 *ade5<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2* törzsek kén-hidrogén termelése YEPD illetve ciszteinnel kiegészített (100 illetve 50 µg/ml) YEPD táplevesekben.

## 5.16 Rögzített ATP-szulfuriláz hiányos *Schiz. pombe* törzsek alkalmazása malo-etanolos fermentációhoz

A *Schiz. pombe* a *Saccharomyces cerevisiae*-vel ellentétben jól erjeszti az almasavat, amelynek során etanol és CO<sub>2</sub> keletkezik (maloalkoholos erjesztés). A *Schiz. pombe* almasavbontó tulajdonságát régóta tervezik a magas almasavtartalmú borok almasav tartalmának csökkentésére. A közelmúltban több kutatócsoport is foglalkozott a maloalkoholos fermentáció alkalmazásának lehetőségével (Snow és Gallander, 1979; Magyar és Panyik, 1989). A hasadó élesztőgomba alkalmazásának egyik akadálya, hogy lassan erjeszt, ezért a *S. cerevisiae* borélesztők gyorsan túlnövik, a másik pedig, hogy sok kéntartalmú vegyületet, többek között kén-hidrogént termel, így rontja a bor minőségét, emiatt utófermentációra sem használható.

Kísérletekkel szerettem volna megvizsgálni, hogy az ATP-szulfuriláz gén inaktiválása nem befolyásolja-e a hasadó élesztőgomba törzs almasavbontó képességét. A kísérleteket a korábbi kísérletekben használt két törzssel (B-579 ill. 0-82 *ade5*<sup>-</sup>) és azok szelenát-rezisztens mutánsaival végeztem el. Mind a négy törzsből logaritmikusan szaporodási fázisban lévő (24 órás) rázatott tenyészetet készítettem, majd a sejteket nátrium-alginát segítségével rögzítettem. Az almasavas táplevest 5 % rögzített sejttel oltottam be.

Az almasavbontó kísérletek során először 0,5 % L-almasavat tartalmazó mesterséges táplevest használtam. A táptalajból 2. illetve 5. nap után vettem mintát, majd a mintáknak meghatároztam az L-almasav tartalmát (14. táblázat). Az eredményekből kitűnik, hogy jelentős (>70 %) almasav tartalom csökkenést az 5. napon lehetett mérni (22. ábra, 15. táblázat). Hasonló mértékű volt az L-almasavtartalom csökkenés mind a szelenát-érzékeny, mind a szelenát-rezisztens törzseknel is, tehát megállapítható, hogy az ATP-szulfuriláz enzim génjének inaktiválása nem befolyásolta az élesztőgomba törzsek L-almasavbontó képességét.

Az L-almasavat tartalmazó tápleves után magas almasavtartalmú borral megismételtem a kísérletet. Mivel a B-579 törzset borból izolálták, valamint a 0-82 *ade5*<sup>-</sup> törzssel összehasonlítva kevesebb kén-hidrogént termel (12. táblázat) és nagyobb mértékben bontotta az L-almasavat, ezt a kísérletet márcsak a B-579 prototróf törzssel és annak szelenát-rezisztens mutánsával végeztem el.

Az almasavas táplevessel összehasonlítva a borban a sejtek már kisebb mértékben, de még mindig jól bontották az L-almasavat. Ez a különbség valószínűleg a borban található szélsőséges körülményeknek volt köszönhető (pl. alacsony pH, alacsony cukortartalom, alacsony N-forrás stb.). Az előző kísérlethez hasonlóan a borban is az 5. nap után volt megfigyelhető jelentős L-almasav tartalom csökkenés.

Törzsek	Lebontott L-almasav (g/l)	
	2. nap	5. nap
0-82 <i>ade5</i> <sup>-</sup>	2,1±0,34	3,9±0,33
0-82 <i>ade5</i> <sup>-</sup> Se <sup>R</sup> -2	2,35±0,26	4,1±0,16
B-579	2,49±0,16	4,5±0,34
B-579 Se <sup>R</sup> -2	2,4±0,31	4,2±0,24

14. táblázat. *Schiz. pombe* B-579 illetve 0-82 *ade5*<sup>-</sup> törzseivel 5 g/l L-almasavat tartalmazó tápleves L-almasav tartalma 2 és 5 napos inkubálás után.



**22. ábra.** *Schiz. pombe* B-579 illetve 0-82 *ade5<sup>-</sup>* vad (S) és szelenát-rezisztens (R) törzseivel L-almasavat tartalmazó táplevesben lebontott L-almasavtartalom %-ban kifejezve 2 és 5 napos inkubálás után.

Minták	Lebontott L-almasav %-ban kifejezve	
	2. nap	5. nap
B-579	26±8,3	61±9,1
B-579 Se <sup>R</sup> -2	28±3,6	65±4,2

**15. táblázat.** Magas almasavtartalmú borban (6,67 g/l) az B-579 és B-579 Se<sup>R</sup>-2 törzsek által lebontott L-almasavtartalom. A minták L-almasav tartalmát 2. és 5. napi növekedés után határoztam meg.

## 5.17 ATP-szulfuriláz hiányos törzsek kén-hidrogén termelésének vizsgálata

Az almasavas táplevesben *Schiz. pombe* szelenát-érzékeny és rezisztens törzsek által termelt kén-hidrogén mérése azt mutatta, hogy az érzékeny, jó kén-hidrogén termelő törzsekkel ellentétben a rezisztens törzsek nem, vagy csak nagyon kis mértékben (méréshatár alatt) termelnek kén-hidrogént. Összehasonlítás céljából megmértem szelenát-érzékeny és -rezisztens törzsek kén-hidrogén termelését borban való 5 napi inkubálás után.

Steril bort beoltottam *Schiz. pombe* szelenát-érzékeny illetve -rezisztens törzsek rögzített sejtjeivel. Mivel a bor szélsőséges tápközeg, beoltás előtt a borhoz 1% glükózt és 0,025% tioszulfátot adtam, elősegítve ezzel a sejtek életképességének fenntartását illetve a kén-hidrogén termelését. A beoltott bort 25°C-on 5 napig inkubáltam, majd megmértem a borban található kén-hidrogén mennyiségét (lásd 16. táblázat).

Ahogy az eredményekből is kitűnik, hogy a szelenát-érzékeny sejtek termeltek kis mennyiségű kén-hidrogént, míg a szelenát-rezisztens törzseknél nem volt mérhető kén-hidrogén termelést. A két vizsgált törzs közül az L-972 törzs, hasonlóan a YEPD táplevesben elvégzett kísérletek esetében, nagyobb kén-hidrogén termelőnek bizonyult, mint a B-579 törzs.

Törzsek	Kén-hidrogén mennyisége	
	ng H <sub>2</sub> S/mg száraz anyag	ng H <sub>2</sub> S/ml bor
L-972	30,4±5,65	24,32±4,52
L-972 Se <sup>R</sup> -2	<4	<3,2
B-579	10,3±1,414	8,24±1,131
B-579 Se <sup>R</sup> -2	<4	<3,2

**16. táblázat.** *Schiz. pombe* szelenát-érzékeny (L-972, B-579) és -rezisztens (L-972 Se<sup>R</sup>-2, B-579 Se<sup>R</sup>-2) törzsei által borban termelt kén-hidrogén mennyisége. Paraméterek: 25°C, 5 nap inkubálás, 10 percig inert nitrogén gázzal való átlegegőztetés.



## 5.18 Bor aromaspektrumának változása maloetanolos fermentáció után

*Schizosaccharomyces pombe*-t az almasavtartalom csökkentés céljából többek között a magas kén-hidrogén termelése miatt nem alkalmazzák. Az irodalomban nem található közölt adat a *Schiz. pombe* élesztőgombával erjesztett bor aroma spektrumáról. Gázkromatográfia segítségével az 5. nap után vett mintáknak megnéztem az aroma spektrumát, hogy minőségileg és mennyiségileg is összehasonlítsam a *Schiz. pombe* B-579 szelenát-érzékeny és szelenát-rezisztens törzseivel kezelt bor, valamint a kezeletlen (kontrol) bor aromaspektrumát.

A borban gázkromatográfia segítségével 16 aroma vegyületet tudtunk azonosítani, amelyek közül 8 vegyületnél (a táblázatban pirossal jelölve) szignifikáns eltérés figyelhető meg a bor és a minták között. A szelenát-érzékeny illetve -rezisztens sejtes minták között lényeges eltérés nem volt kimutatható (lásd 17. táblázat).

Vegyület	kezeletlen bor	B 579 S	B 579 R
3-metil-butanol	242	228	213
etil-butirát	15.6	10	6.7
2-pentanol	2.3	4	2.9
<b>3-metil-butil-acetát</b>	<b>345.6</b>	<b>112</b>	<b>83</b>
kapronsav	8.7	6.4	6.5
<b>etil-hexanoát</b>	<b>518.9</b>	<b>134</b>	<b>105.7</b>
<b>hexil-acetát</b>	<b>41</b>	<b>6</b>	<b>4.5</b>
oktánsav	123	76	83.8
<b>etil-oktanoát</b>	<b>2763</b>	<b>720</b>	<b>560</b>
<b>dekanal</b>	<b>37.6</b>	<b>5.8</b>	<b>4.4</b>
2-feniletil-acetát	12.3	7.1	6.1
etil-nonanoát	8.8	4.2	4.1
<b>etil-9-decenoát</b>	<b>44</b>	<b>9.3</b>	<b>6.5</b>
etil-decanoát	72	177	133
<b>izoamil-oktanoát</b>	<b>28.5</b>	<b>4.7</b>	<b>3.3</b>
<b>etil-laurát</b>	<b>93</b>	<b>27.9</b>	<b>27.5</b>

**17. táblázat.** A kezelt, illetve az alapbor gázkromatográfiával mért aroma vegyületei. A pirossal jelölt vegyületeknél szignifikáns eltérés figyelhető meg a bor és a minták között.

## 6 EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

### 6.1 A *Schiz. pombe* ATP-szulfuriláz génjének klónozása

A munkám elsődleges célja az volt, hogy molekuláris biológiai módszerekkel meghatározzam a tanszéki csoport által izolált szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító mutánsoknál inaktivált gént. Ezek a mutánsok a szelenát-rezisztencia mellett nem képesek a szulfátot és a metionint egyedüli kénforrásként felhasználni. A vad típusú, szelenát-érzékeny szülői törzsek mindkét előbb említett kénforrást jól hasznosították. A szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító mutáns törzseknél kimutatták, hogy a szulfát felvételük erősen csökkent, cisztein vagy szulfid kénforráson azonban jól növekedtek (Bánszky és mtsi, 2003).

A *S. cerevisiae* metionin auxotróf mutánsainál hét gén inaktiválása okozhatja a szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító fenotípust: szulfát-permeáz, ATP-szulfuriláz, APS-kináz, PAPS-reduktáz és a metionin hasznosítást szabályzó transzkripció aktivátorokat kódoló gének (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

A cisztein auxotróf/szelenát-rezisztens mutánsoknál az inaktivált gén megkeresésére a génbank szkrínelési módszert alkalmaztam: a szelenát-rezisztens törzset genomiális génbankokkal transzformáltam, majd az izolált pozitív transzformánsokból izoláltam a komplementáló DNS szakaszt tartalmazó plazmidot. A génbankkal való szkrínelés alapfeltétele egy nagyhatékonyságú transzformációs eljárás ( $10^5$ - $10^6$  transzformáns/ $\mu$ l pDNS) kidolgozása, ezért először a 0-82 *ade5*<sup>R</sup> Se<sup>R</sup>-2 mutáns törzs és a D-18 *ura4* jól transzformálható törzs fúziója után izolált S-18-82 *ura4* Se<sup>R</sup>-2 törzstre az üres pUR18N vektor segítségével kidolgoztam egy hatékony transzformációs módszert. A nagyhatékonyságú transzformációs gyakoriság kidolgozásánál kétféle módszert próbáltam ki: lítium-acetátos módszert és az elektroporációt. Az irodalomban nagy hatékonyságú elektroporációs eljárást a *S. cerevisiae* (Hill, 1989; Delorme, 1989), *Hansenula polymorpha* (Faber és mtsi, 1993), *Candida maltosa* (Kasuske és mtsi, 1992) és a *Candida utilis* (Kondo és mtsi, 1995) élesztőgombáknál írtak le. A *Schiz. pombe*-nél a lítium-acetátos módszerrel értek el nagy transzformációs hatékonyságot (Okazaki és mtsi, 1990). A harmadik transzformációs módszer, a szferoplasztos transzformáció többek között a *Candida albicans*-nál használatos, ugyanis ennél a gombánál mind a lítium-acetátos, mind pedig az elektroporációs eljárás alacsony transzformációs hatékonysággal működik (Backer és mtsi, 1999).

A lítium-acetátos módszerrel  $10^3$ - $10^4$  sejt/ $\mu$ g pDNS transzformációs gyakoriságot sikerült elérnem, ami az irodalomban közöltekénél ( $10^5$ - $10^6$  sejt/ $\mu$ g pDNS; Okazaki és mtsi, 1990) nagyságrenddel kisebb. Ez a különbség feltehetőleg annak tulajdonítható, hogy az irodalomban közölt eljárás kidolgozásánál más vektort használtak. Az elektroporáció alkalmazásával sikerült egy nagyságrendnyivel nagyobb transzformációs gyakoriságot elérnem, mint a lítium-acetátos módszerrel. A legnagyobb transzformációs gyakoriságot a sejtfaloldó enzimmel ill. a ditiotreitol+lítium-acetát oldattal kezelt sejtek esetében értem el. Bár az irodalomban a *S. cerevisiae*-nél a merkaptotanolos kezelést alkalmazzák (Hill, 1989; Delorme, 1989), meglepően az általam használt *Schiz. pombe* törzsek esetében a merkaptotanolos kezelés után kaptam a legkisebb transzformációs gyakoriságot.

A génbank szkrínelés során három génbankkal transzformáltam az S 18-82 *ura4* Se<sup>R</sup>-2 törzset. A transzformálás után csak a két hosszabb genomiális DNS szakaszokat tartalmazó génbankok esetében kaptam pozitív telepeket, míg a kisebb mérettartományú genomiális DNS szakaszokat tartalmazó pURC2S génbank esetében többszöri próbálkozás után sem sikerült pozitív telepeket izolálnom. Ez feltételezhetően annak tudható be, hogy kisebb mérettartományú génbank készítésénél a genomiális DNS-t a *SalI* restrikciós enzimmel tovább emésztették, így a keresett gén teljes egészében nem maradt meg ennél a génbanknál. A kiválasztott pozitív klónból (S-18-82/C7)

izolált, majd különböző restrikciós enzimekkel megemésztett plazmid nagyságából arra lehetett következtetni, hogy a plazmid kb. 4,5 kbp hosszú szakaszt tartalmaz. A pozitív klónok, a várakozásnak megfelelően a vad típusú törzs fenotípusát hordozták (szelenát-érékeny, szulfát hasznosító).

Újonnan szintetizált primerekkel sikerült megszekvenálni a DNS szakasz teljes hosszát. Szekvencia analízist követően megállapítottam, hogy az adott DNS szakasz két 300 bp-nál nagyobb potenciális ORF-et tartalmaz. A hosszabb ORF 100 %-os homológiát mutatott a *Schiz. pombe* genom projekt során talált SPBC27.08c-nek elnevezett ORF-el (Wood és mtsi, 2002), amely nagy homológiát mutatott a *S. cerevisiae* ATP-szulfuriláz enzimet kódoló *MET3* génnel. A SPBC27.08c gén szekvenálását Yanagida, M. és mtsai (Kyoto Egyetem) végezték el. A SPBC27.08c gén a hasadó élesztőgomba genomjában a II. kromoszómán helyezkedik el (Wood és mtsi, 2002).

A két ORF közül nagy valószínűséggel az ATP-szulfuriláz enzimet kódoló gén inaktiválása felelős a szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító fenotípusért. Ennek bizonyítására az *sua1* gént *SphI* restrikciós enzim segítségével kivágtam a klónozott DNS szakaszból, és visszaklónoztam egy üres pUR18N vektor *SphI* restrikciós enzim hasító helyére.

Az ATP-szulfuriláz gén nagysága fajon belül is változó. Míg az *Asp. fumigatus* ATP-szulfuriláz enzimét kódoló gén 2.257 nukleotidból áll (De Lucas és mtsi, 2001), addig az *Asp. nidulans*-é 32 nukleotiddal (Borges-Walmsles és mtsi, 1995) míg az *Asp. terreus*-é 126 nukleotiddal rövidebb (Schierová és mtsi, 2000). A *Schiz. pombe*-nél talált ATP-szulfuriláz génje a maga 1473 nukleotidjával a gombáknál eddig leírt ATP-szulfuriláz gének közül a legkisebb. A *S. cerevisiae*-vel ellentétben, amely 5 intront is tartalmaz (Cherest és mtsi, 1987), a *Schiz. pombe*-nél talált ATP-szulfuriláz génben intron nem található. Az eddig leírt élesztőgombák (*S. cerevisiae*, *C. albicans*) ATP-szulfuriláz génjeihez hasonlóan az *sua1* gén sem tartalmaz a penészgombák ATP-szulfuriláz C-terminális végére jellemző APS-kináz-szerű régiót (Ullrich és mtsi, 2001). Az APS régió hiányából arra lehet következtetni, hogy az ATP-szulfuriláz enzimet a PAPS molekula jelenléte alloszterikusan nem gátolhatja. Ez a gátlás a penészgombáknál megfigyelhető (Martin és mtsi, 1989; Renosto és mtsi, 1990), de APS-kináz aktivitással nem párosul (Marzluf, 1997). Az ATP-szulfuriláz gén szekvenciája szerint felállított dendrogram alapján a *S. cerevisiae* a *C. albicans*-val, az *A. terreus* pedig a *P. chrysogenum*-mal mutat nagy hasonlóságot, míg a *Schiz. pombe* egy külön ágat képvisel.

Az evolúció különböző fokán álló élőlényeknél eddig leírt ATP-szulfuriláz génekre jellemző domének (<sup>189</sup>VxAFQxRNP, <sup>200</sup>HxG/AH, <sup>286</sup>VGRDHAG, <sup>354</sup>ISGTxxR) a hasadó élesztőgombánál is megtalálhatók. A VGRDHAG motív GRD szakasza egy erősen konzervatív szakasz, amelyről ismert, hogy fontos szerepe van a szubsztrát megkötésében (Ullrich és mtsi, 2001). Az *sua1* génnél viszont a GRD szakaszt megelőző aminosavban (V-valin) eltérés figyelhető meg: a többi eukarióta élőlényeknél leírt ATP-szulfuriláz enzimekhez képest az *sua1* génben a 286-os pozícióban valin helyett izoleucin (I) található. Hasonló valin-izoleucin csere található a *Riffia pachyptilia*, *Chromatium vinosum*, *Entamoeba histolytica* és a *Chlamydomonas reinhardtii* mikroorganizmusoknál is. Az *Archeobolus archea* ATP-szulfuriláz enzimében valin-fenilalanin aminosavcsere figyelhető meg. A *S. cerevisiae*-nél leírták, hogy a <sup>286</sup>VGRDHAG régióban a 291-es pozícióban található alanin cseréje más aminosavval az ATP-szulfuriláz enzim aktivitásának csökkenését vagy elvesztését vonja maga után (Deyrup és mtsi, 1999; Venkatachalam és mtsi, 1999).

Cherest és mtsi (1987) részletbemenően analizálták a *S. cerevisiae* *MET3* génjét. Összehasonlítva az *sua1* génnel sok hasonlóságot találunk. Ezek közé tartozik az *sua1* gén 5' végén található 9 nukleotid hosszú szekvencia, amely feltehetőleg a gén szabályozásáért felelős. Hasonló szekvencia található a *S. cerevisiae* több más a metionin metabolizmusában részt vevő gének előtt is (*MET2*, *MET25*). Hill és mtsi (1986) leírták, hogy az aminosavak szintézisének regulációjában

szereplő gének előtt álló TGACTC szekvencia játszik szerepet. Azonban sem a *S. cerevisiae* *MET3* génje (Cherest és mtsi, 1987), sem pedig az *sua1* gén 5' végén nem volt megtalálható ez a szekvencia. Ebből adódóan sem a *S. cerevisiae*, sem pedig a *Schiz. pombe* ATP-szulfuriláz génje nem tartozik az általános aminosavak szintézisének regulációja alá.

A szelenát-rezisztens mutáns törzsek ATP-szulfuriláz hiányát az adott enzim aktivitásának mérésével is sikerült bizonyítanom. Az vad típusú és szelenát-rezisztens törzsek ATP-szulfuriláz aktivitása nagymértékben különbözött: a szelenát-rezisztens mutáns gyakorlatilag nem mutatott enzimaktivitást, míg a vad típusú sejteknél közepes enzimaktivitást kaptunk. Hasonló különbséget mértem az S 18-82 *ura4<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>* és az S 18-82/C7 szelenát-érzékeny pozitív transzformáns esetében is. A mért alacsony enzimaktivitás azzal magyarázható, hogy a szelenát-rezisztens törzsek ATP-szulfuriláz kódoló génje sérült. Csökkent ATP-szulfuriláz aktivitás mellett nem épül be a sejt növekedéséhez elegendő kén a szerves kén tartalmú vegyületekbe, amely a sejt anyagcsere folyamatainak leállításához vezet.

A *S. cerevisiae* ATP-szulfuriláz kódoló *MET3* génben sérült mutánsa szintén nem képes a szulfátot egyedüli kénforrásként hasznosítani. Az irodalomban már leírták, hogy az *Arabidopsis thaliana* és a burgonya képes a *S. cerevisiae* *met3* mutánsát komplementálni (Klonus és mtsi, 1994; Leustek és mtsi, 1994). A *S. cerevisiae* CC371-4B *met3* mutáns törzsének *sua1* génnel való transzformálásával sikerült bizonyítani, hogy a *Schiz. pombe* ATP-szulfuriláz génje is képes hasonló komplementálásra, ezzel is bizonyítva, hogy az ATP-szulfuriláz gén a konzervatív gének közé tartozik.

## 6.2 Az *sua1* gén szelekciós markerként való alkalmazhatósága

Mivel az ATP-szulfuriláz génben sérült mutánsok izolálása egyszerű, és a mutánsok izolálásánál, valamint a pozitív transzformánsok szelektálásánál pozitív szelekció alkalmazható, ezért az *sua1* gént a *Schiz. pombe* transzformálásánál mint szelekciós marker lehetne használni. A transzformációt követően a pozitív klónok izolálásánál negatív (szelenát-érzékeny), illetve pozitív szelekció (szulfát illetve metionin hasznosító) is alkalmazható.

Az ATP-szulfuriláz gén szelekciós markerként való alkalmazhatóságát először Buxton és mtsi (1989) írták le. Az *Asp. nidulans*-ból izolált ATP-szulfuriláz enzimet kódoló *sC* gént használták szelekciós markerként. Az *sC* gént tartalmazó pFB75 vektorral transzformáltak szelenát-rezisztens/kromát-érzékeny, ATP-szulfuriláz hiányos *Asp. nidulans* és *Asp. niger* törzseket és minimál táptalajon *sC<sup>+</sup>* transzformánsokat izoláltak. Egy másik *Aspergillus* fajnál, az *Aspergillus fumigatus* patogén penészgombánál is már létrehoztak egy plazmidot (pSCFUM), amely szelekciós markerként az ATP-szulfuriláz enzimet kódoló *sC* gént tartalmazza (De Lucas és mtsi, 2001). Egy 3,8 kbp hosszú, *sC* gént tartalmazó DNS inzertet klónoztak a pUC19 vektor *Bam*HI restrikciós helyére. Az így kapott 6,5 kbp hosszú vektorral, egy viszonylag gyenge transzformációs hatékonysággal (39-53 *sC<sup>+</sup>* transzformáns/μg DNS) transzformáltak ATP-szulfuriláz génben sérült törzseket. A pozitív transzformánsokat MgSO<sub>4</sub>-t egyedüli kénforrást tartalmazó táptalajon izolálták. De Lucas és mtsi (2001) rámutatnak arra is, hogy a vektor elvesztése könnyen kivitelezhető, hiszen az *sC* markert nem hordozó sejtek szelenát-rezisztensekké válnak.

Az *sua1* gén klónozásával a *Schiz. pombe*-nél is megvalósítható egy szelenát-rezisztens/szelenát-érzékeny fenotípus változást okozó vektor létrehozása. Hasonló elven működik a kanavanin-rezisztens/kanavanin-érzékeny fenotípus változást előidéző *S. cerevisiae* *CAN1* génjének szelekciós markerként való alkalmazása. A *S. cerevisiae* arginin-permeáz kódoló *CAN1* génjét használják a *Schiz. pombe* *can1<sup>-</sup>* mutánsának transzformálása során. A *can1<sup>+</sup>* arginin prototróf sejt érzékeny az arginin toxikus analógjaként ismert kanavaninra, ezzel ellentétben a *can1<sup>-</sup>* mutáns arginin auxotróf/kanavanin-rezisztens.

A pUR18N+2,3 kbp plazmiddal transzformált mindhárom szelenát-rezisztens törzs (0-82 *ade5<sup>R</sup>*-2, B-579 *Se<sup>R</sup>*-2, 0-121 *trp1<sup>R</sup>arg1<sup>R</sup>* *Se<sup>R</sup>*-2) esetében kaptam pozitív transzformánsokat. A transzformációs gyakoriság nem volt magas ( $10^2$ - $10^3$  körüli), ami azzal magyarázható, hogy egy viszonylag nagy méretű plazmidot használtam a transzformációnál (kb. 7,8 kbp), amely két szelektív markert is tartalmazott (*sua1*, *ura4*). A plazmid méretének csökkentésével esetleg növelhető lehetne a transzformáció hatékonyság. Ezt legkönnyebben az *ura4* gén *sua1* génre való cseréjével lehetne elérni, így a MCS génbankok készítésénél is felhasználható lehetne.

### 6.3 *Schiz. pombe* szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító törzsek borászatban való felhasználásának lehetősége

Az élesztőgombák által termelt kén-hidrogén gondot okoz mind a sörgyártás során, mind pedig a borászatban. A sörgyártásban e probléma megoldására különböző gének klónozásával próbálkoztak. Asszimilálható nitrogénforrás hiányában a *S. cerevisiae*-nél kén-hidrogén termelés figyelhető meg. Nitrogén hiány esetén a kén-hidrogén termelés az exponenciális fázisban a legnagyobb (Jiránek és mtsi, 1995). Először Stratford és Rose (1986) mutatott rá, hogy a borászatban használt élesztőgombák kén-hidrogén termelése főleg a szerves kénforrások asszimilációjától függ. A bor erjedése során a szerves kénforrások redukciós útja szükségszerű, ugyanis a must az élesztőgombák számára nem tartalmaz kellő mennyiségben szerves kénforrásokat. Az élesztősejt szerves kénforrás hiányakor szulfátot és szulfítot hasznosít, amelyek redukciója során kén-hidrogén keletkezik. A szulfitból keletkezett kén-hidrogén mennyisége a sejten belüli szulfit mennyiségétől függ, vagyis a szulfit-reduktáz enzimet a végtermék mennyisége nem szabályozza (Jiránek és mtsi, 1995).

Mivel a *Schiz. pombe* nagyobb kén-hidrogén termelő, mint a *S. cerevisiae* (Rankine, 1964), ezért amíg az előbbi kén-hidrogén termelésének jelentős mértékben való csökkentése nem megoldott, borászatban nem alkalmazható. A szelenát-rezisztens mutáns törzsek szulfátot, mint egyedüli kénforrást nem képesek hasznosítani, ezért feltételeztem, hogy kevesebb kén-hidrogént termelnek, mint a vad típusú törzsek, amit kísérletekkel bizonyítottam is. Cisztein hozzáadása után a vad típusú törzs kén-hidrogén termelése is megszűnt. Jiránek és mtsi (1995) különböző aminosavakkal kiegészített nitrogén szegény táptalajban mérték a kén-hidrogén termelését két *S. cerevisiae* borélesztő törzsnek, és arra a következtetésre jutottak, hogy a cisztein ill. a metionin jelenléte nagyban (10-20 szorosára) megnövelte a sejtek kén-hidrogén termelését. Ebben az esetben az egyes aminosavak képzésénél a kéntartalmú aminosavak szolgáltak nitrogénforrásként, tehát a cisztein ill. metionin molekulákban található kén kén-hidrogén formájában választódott ki a sejtől. Az általam elvégzett kísérletekben az élesztőkivonatot és peptont tartalmazó komplex tápoldat elegendő nitrogénforrásként szolgált az élesztősejtek számára. Ebből adódóan a cisztein csak kénforrásként szolgált, vagyis a cisztein fedezte a sejtek kénforrás szükségletét, és egyben represszálta is a szulfát redukciós útból résztvevő gének expresszióját.

A *Schiz. pombe*, a *S. cerevisiae*-vel ellentétben jól bontja az almasavat, ezért a borászatban mint potenciális almasavbontó mikroorganizmus jöhet szóba. Organoleptikus szempontból azonban a bor almasavtartalmának lebontása, csak részlegesen ajánlott (Magyar és Panyik, 1989). A *Schiz. pombe* borászatban való alkalmazása csak két tényező kiküszöbölése után lehetséges: a kéntartalmú vegyületek (főleg kén-hidrogén) termelésének visszaszorítása, illetve az almasavtartalom lebontásának szabályozhatósága.

Az első probléma a szelenát-rezisztens *Schiz. pombe* törzsek alkalmazásával lehetne kiküszöbölni. Taillandier és Strehaiano (1991) megállapították, hogy a tápközeg glükóztartalma nem befolyásolja a hasadó élesztősejtek almasavbontó képességét, de a sejtek életképessége nagyban csökken. Az általam vizsgált szelenát-rezisztens és szelenát-érzékeny törzsek mesterséges

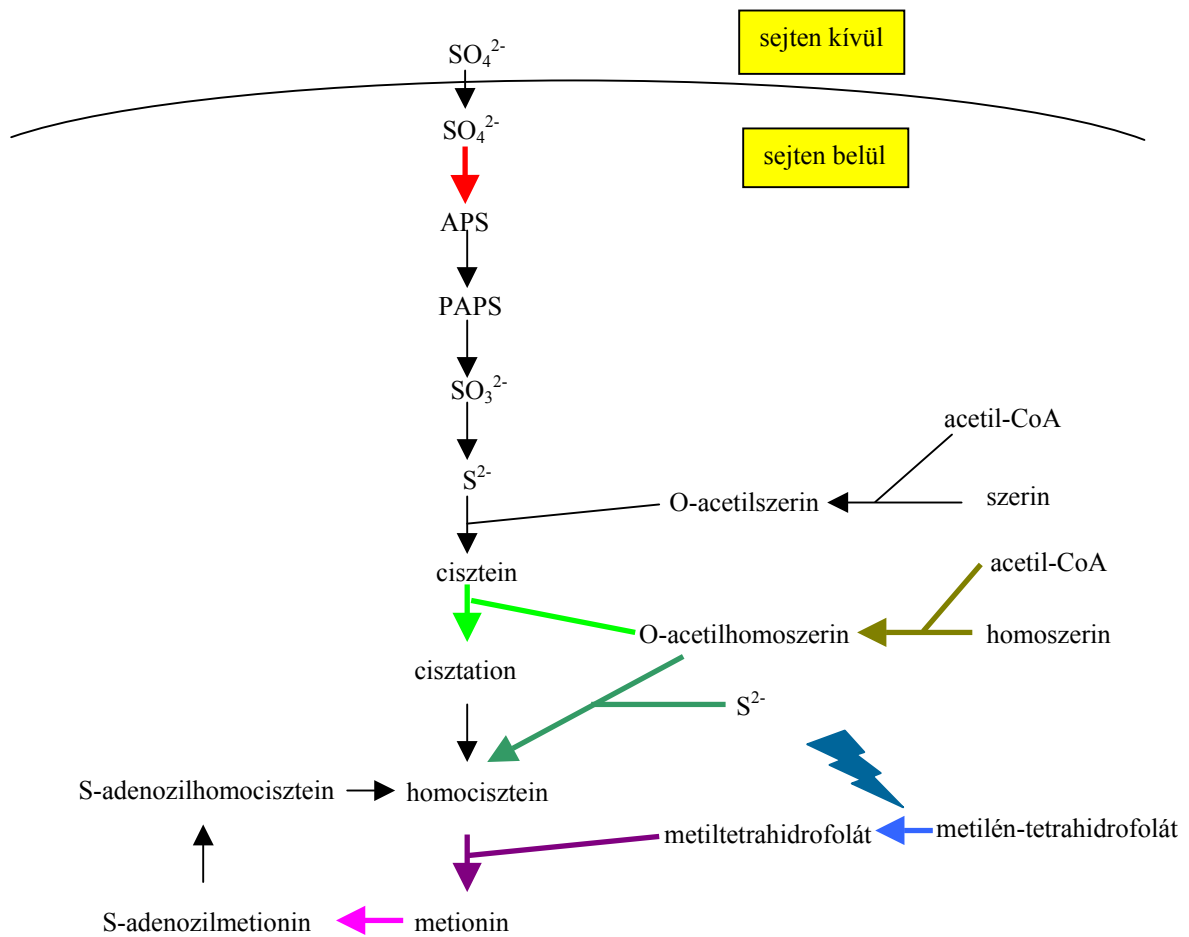
táplevesben jó bontották az almasavat. Az 5. nap után a kiinduló almasavtartalom kb. 90 %-át voltak képesek lebontani. A borból izolált B-579 törzs valamivel jobban bontotta az L-almasavat, mint a 0-82 *ade5* törzs. Borban rögzített sejtekkel elvégzett kísérleteknél a lebontott almasavtartalom mennyisége már kevesebb volt (60 % körüli). A különbség azzal magyarázható, hogy a glükózt tartalmazó mesterséges táplevesben az élesztősejtek életképessége megmarad, míg az alacsony pH-jú, glükózmentes bor inkább szélsőséges tápközegnek tekinthető a sejtek számára. Ilyen közegben a sejtek bár szaporodni nem képesek, azonban almasavbontó képességük megmarad. Mivel az almasavbontás energiaigényes folyamat, a glükóztartalmú tápközegben a glükózzal fedezik energiaigényüket, míg glükózmentes tápoldatban a sejtek felemésztik energiaforrásukat, így életképességük csökken (Taillandier és Strehaiano, 1991).

A szelenát-érzékeny törzsek borban is nagy mennyiségű kén-hidrogént termeltek, ellentétben szelenát-rezisztens párjukkal, amely akárcsak a mesterséges táplevesben, borban sem termelt kimutatható mennyiségű kén-hidrogént. A borban az általam mért aromaanyagok egyes összetevőinek mennyiségét a *Schiz. pombe* jelentősen megváltoztatta. A szelenát-érzékeny ill. -rezisztens törzsekkel kezelt borok aromaszpektruma közötti szignifikáns eltérés nem volt megfigyelhető.

#### 6.4 *Schiz. pombe* kénmetabolizmusban szerepet játszó fenotípusilag jellemzett génjei

Az irodalomban ezidáig mindössze 4, a kénmetabolizmusban szerepet játszó *Schiz. pombe* gént sikerült klónozni és egyben fiziológiailag jellemezni (*met9*, *met11*, *met25*, *sam1*, lásd 23. ábra). Az *sua1* gén az ötödik, a szulfát aktivációs útjának pedig az első klónozott és jellemzett génje. A szulfát hasznosításon keresztül a metionin hasznosításban is jelentős szerepet játszik, amennyiben a metionin mint egyedüli kénforrás van jelen, ugyanis a *S. cerevisiae* élesztőgombával ellentétben a hasadó élesztőgombának nincs sem cisztation- $\beta$ -szintáz, sem pedig cisztation- $\gamma$ -liáz génje (Brzywczy és mtsi, 2002), így a metionint úgy tudja ciszteinné átalakítani, hogy a metionint először teljesen lebontja (szulfát anion  $\text{SO}_4^{2-}$  keletkezik), majd a szulfát anionból a szulfát metabolikus úton keresztül cisztein képződik (Bánszky és mtsi, 2003).

A jellemzett géneken kívül több metionin hiányos auxotróf törzset írtak le. Bizonyos metionin hiányos törzseknél meghatározták a sérült gént (*met6*, *met7*, *met10*), néhánynak viszont csak a kromoszómán való helyét határozták meg (*met1-met5*; Kohli és mtsi, 1977). Azóta ismertté vált a *Schiz. pombe* genom szekvenciája, aminek eredményeit kihasználva meghatároztam a *met1-met5* mutánsok sérült génjeit. Naula és mtsi-nak (2002) véleményével ellentétben a *Schiz. pombe*-nek, a *S. cerevisiae*-hez hasonlóan (*MET6*, *SAM4*), két homocisztein-metil-transzferáz génje van (*met1*-SPAC57A7.07c, *met2*-SPAC9.09). Mivel a *met1* mutáns ciszteinen nem mutatott növekedést, ezért feltehetően a két homocisztein-metil-transzferáz enzim közül az előbb említett enzimnek nagyobb az aktivitása. Ezzel magyarázható, hogy ciszteinen a kisebb aktivitással bíró *met2* gén inaktiválása esetén az aktív *met1* gén kódolta enzim még képes "életben tartani" a sejtet. A *Schiz. pombe*-nek a már említett két metiltetrahidrofolát-reduktáz enzime mellett (*met9*, *met11*; Naula és mtsi, 2002) két homocisztein-metiltranszferáz enzimmel is rendelkezik.



- homocisztein-szintáz (*met25*)
- metiléntetrahidrofolát-reduktáz (*met9*=*met5*, *met11*)
- adenosilmetionin-szintáz (*sam1*)
- ATP-szulfuriláz (*sua1*)
- homocisztein-metiltranszferáz (*met1*, *met2*)
- homoszerin-O-acetiltranszferáz (*met4*=*met6*)
- cisztation- $\gamma$ -szintáz (*met3*=*met7*)
- a *met9* gén szupresszora (*met10*)

**23.ábra.** A *Schiz. pombe* szulfát-metabolizmusa a cisztein és metionin bioszintézishez kapcsolódva. Színessel a már leírt gének vagy az egyes mutánsoknál inaktivált gének vannak feltüntetve. Gének: *met25*-homocisztein szintáz (Brzywczy és mtsi, 2002), *met9* (= *met5*) és *met11*-metiléntetrahidrofolát reduktáz (Naula és mtsi, 2002), *sam1*- adenosilmetionin szintáz (Hilti és mtsi, 2000), *sua1*-ATP-szulfuriláz (Simonics és mtsi, 2002). Mutánsok: *met1*-*met5*-Kohli és mtsai (1977); *met6*, *met7* és *met10*- Schweingruber és mtsi (személyes közlés).

## 7 ÖSSZEFOGLALÓ

A kéntartalmú aminosavak bioszintéziséhez minden mikroorganizmusnál szükségszerű a megfelelő mennyiségű kénatom felvétele, majd a felvett kénforrás redukciójára szulfidra. Az élesztőgombák több transzport és biokémiai enzimrendszerrel rendelkeznek, melyek biztosítják a különböző szerves és szervetlen kéntartalmú vegyületek kénforrásként való felhasználhatóságát. Az élesztőgombák számára a környezetben legnagyobb mennyiségben előforduló egyik anion, a szulfát jelenti a legfőbb szerves kénforrást.

Az egyik legintenzívebben kutatott gombafaj, a *Schizosaccharomyces pombe* fiziológiájáról és genetikájáról már sokat tudunk, azonban kénmetabolizmusa kevésbé ismert. Kutatásaim kezdetéig egyetlen, a szulfát asszimilációban szerepet játszó gént sem írtak le. Kutatásaimmal párhuzamosan egy berni kutatócsoport (Schweingruber és mtsi) a kén szerves molekulákba való beépülését katalizáló enzimek közül négyet (*sam1*, *met25*, *met9*, *met11*) publikált. Kohli és mtsi (1975) 5 metionin auxotróf törzset izoláltak, amelyeket véletlenszerűen neveztek el (*met1-met5*) és klasszikus módszerrel a kromoszómákra térképezték.

Kutatócsoportunknak szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító törzsek vizsgálatával sikerült bizonyítani, hogy a *Schiz. pombe* a metionint úgy tudja ciszteinné alakítani, hogy a metionint először teljesen lebontja, így  $\text{SO}_4^{2-}$  keletkezik, majd a szulfát anionból a szulfát redukciós úton keresztül képződik cisztein. Ennek tulajdonítható, hogy a szulfát asszimilációs útból sérült szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító törzsek a metionint egyedüli kénforrásként nem képesek hasznosítani (Bánszky és mtsi, 2003).

Értekezésem fő célja ezeknek a szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító törzseknek fiziológiai és molekuláris biológiai jellemzése volt, majd pedig annak vizsgálata, hogy ezek a mutánsok rögzített sejtes rendszerben kevesebb kén-hidrogént termelnek-e, mint a vad típusú törzsek.

Munkám elején egy szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító mutáns (0-82 h<sup>-</sup> *ade5<sup>-</sup>* Se<sup>R-2</sup>) és egy *ura4<sup>-</sup>* mutációt hordozó transzformálható törzs (D-18 *ura4<sup>-</sup>*) fúzióját követően benomilos táptalajon szelenát-rezisztens, uracil hiányos rekombináns törzset (S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R-2</sup>) izoláltam, amely alkalmas volt *ura4<sup>-</sup>* szelektív markert hordozó vektorral való transzformációra. A *Schiz. pombe* élesztőgombánál leggyakrabban használatos és legnagyobb hatékonysággal működő transzformációs eljárás a lítium-acetátos transzformáció. Mivel az újjal izolált törzs esetében nem sikerült elég nagy transzformációs gyakoriságot elérnem, ezért elektroporációval próbálkoztam. A klónozó gazdaként alkalmazni kívánt S 18-82 *ura4<sup>-</sup>* Se<sup>R-2</sup> törzsről kidolgoztam egy nagyhatékonyságú transzformációs eljárást. Elektroporáció előtt a sejtfa szerkezetének fellazítása érdekében a sejteket detergens, sejtfaloldó enzim és lítium-acetát különböző kombinációival kezeltem. A lítium-acetátos transzformációhoz képest valamennyi kezelés esetében nagyobb hatékonyság növekedést értem el. A legjobb eredményt adó kezelés a transzformációs gyakoriságot  $6 \cdot 10^4$  transzformáns/μg DNS értékre növelte, amely már elegendőnek tekinthető a génbankkal való transzformációhoz.

A két legnagyobb transzformációs gyakoriságot biztosító elektrokompetens sejteket három különböző inzert méretű *Schiz. pombe* génbankkal transzformáltam, majd egyedüli kénforrásként szulfátot tartalmazó minimál táptalajon pozitív transzformánsokat izoláltam. A transzformánsoknál a komplementálódott szulfát hasznosításért felelős gén expressziója biztosította a jó szaporodást. A transzformánsok szelenát-érzékenysége megegyezett vad típus szelenát-érzékenységével. Az egyik pozitív transzformánsból (C7 klón) plazmidot izoláltam, majd megszekvenáltattam a klónozott genomialis DNS szakaszt. Homológ szekvenciákat keresve a klónozott DNS szakasz szekvenciáját összevettem a BLASTN, BLASTX adatbázisokban található *Schiz. pombe* szekvenciákkal. Az



említett adatbázisokban egy homológ DNS szekvenciát találtam (kozmid 1228), amely teljes hosszúságban (4477 bp) tartalmazta a C7-es plazmidban klónozott genomiális DNS szakaszt. A kozmid 1228 a *Schiz. pombe* "GENOM PROJECT" részeként lett megszekvenáltatva (Woods és mtsi, 2002). A homológia alapján talált kozmidok kromoszómán való elhelyezkedéseiből megállapítható, hogy a C7 klónban klónozott DNS szakasz közel a centromérához a II. kromoszóma bal "karján" található.

A C7-es plazmidban klónozott, közel 4,5 kbp hosszú DNS szakaszon két ORF-et találtam. Szubklónozással bebizonyítottam, hogy a két ORF közül a más élőlények ATP-szulfurilázaival nagyfokú homológiát mutató gén felelős a szulfátot nem hasznosító/szelenát-rezisztens fenotípusért. A *Schiz. pombe* ATP-szulfuriláz génjét *sual* génnek neveztem el.

Az 1473 bp hosszú *sual* gén ORF szekvenciája egy 490 aminosavból álló fehérje kódolására képes. A gén kezdő kodonja a metionint kódoló ATG, STOP kodonja pedig a TAA. A gén intront nem tartalmaz. Az *sual* gén 3' végén egy adeninben (A) és timinben (T) gazdag szakasz található: a gént követő 210 nukleotid hosszú szakasz A+T tartalma 73 %. A gén STOP kodonja (TAA) után 17 bp-ra egy 11-szer ismétlődő AT szakasz található.

Az *Sual*p-ben megtalálhatók azok a szubsztrát kötésében szerepet játszó konzervatív szekvenciák (<sup>190</sup>VxAFQxRNP, "GRD-loop"), amelyeket más élőlényeknél jellemzett ATP-szulfuriláz enzimek is tartalmaznak. Az *sual* génnél viszont a GRD szakaszt megelőző aminosavban (V-valin) eltérés figyelhető meg: a legtöbb eukarióta élőlényeknél leírt ATP-szulfuriláz enzimekhez képest az *sual* génben a 286-os pozícióban valin helyett izoleucin (I) található. Az *sual* gén által kódolt fehérjének nagysága 54,7 kDa.

A szelenát-rezisztens törzsek gyakorlatilag nem mutattak ATP-szulfuriláz enzimaktivitást, míg a transzformánsoknál az enzimaktivitás a vad típusra jellemző értékre nőtt.

Az *sual*<sup>-</sup> mutációt hordozó *Schiz. pombe* törzseket az *sual* gént tartalmazó vektorral transzformáltam. A transzformáció sikeres volt, ami azt bizonyítja, hogy az *sual* gén mint egyedüli szelekciós marker használható klónozó vektorokban. Ennek előnye, hogy a klónozó cisztein auxotróf gazdák tetszőleges törzsekből pozitív szelekcióval szelenát-rezisztencia alapján izolálhatók, a komplementációval kapott transzformánsok pedig ugyancsak pozitív szelekcióval szulfátot, mint egyedüli kénforrást tartalmazó minimál táptalajon izolálhatók. A transzformánsok nem szelektív körülmények között történő szaporítása során a plazmidvesztés a szelenát-rezisztencia megjelenésével kimutatható, illetve kvantitatívan is meghatározható.

A klónozott *sual* gént *S. cerevisiae* bifunkcionális vektorba vittem át, amellyel az ATP-szulfuriláz génben sérült *S. cerevisiae met3* mutáns törzset transzformáltam. A heterológ transzformáció sikeres volt, a *Schiz. pombe* ATP-szulfuriláz génje képes volt komplementálni a *S. cerevisiae* ATP-szulfuriláz génben sérült mutánst, terminációs szignáljai biztosították a szaporodáshoz szükséges génexpressziót.

Az első kénmetabolizmusban sérült mutánsokat Kohli és mtsi izolálták 1975-ben, akik 5 lókuszhoz térképezték a mutánsokat. Az 5 különböző metionin hiányos törzsnél megvizsgáltam, mely kénforrásokat képesek egyedüli kénforrásként hasznosítani. Ezek, valamint a kromoszómákon elfoglalt helyük, a *Schiz. pombe* publikált genom szekvencia adatok alapján megállapítottam, hogy egyik sem allélikus az *sual* génnel.

Az eredmények alapján valószínű, hogy a *met1* és *met2* mutánsoknál a két különböző homocisztein-metiltranszferáz, a *met3*-nál a cisztation- $\gamma$ -szintáz, a *met4* mutánsnál a homoszerin-O-acetiltranszferáz a *met5*-nél pedig a metil-tetrahidrofolát-reduktáz gént inaktiválták. Valószínű, hogy az utóbbi a Naula és mtsi (2002) által *met9*-ként leírt génnel allélikus.

Doktorandusz társam, Bánszky Luca doktori munkája során szabad sejtes kísérletekkel vizsgálta a szelenát-rezisztens és szelenát-érzékeny törzsek almasavbontó képességét illetve kénhidrogén termelését. A szabad sejtes eljárás hátránya, hogy az almasavtartalom kívánt szintre

csökkentése után a *Schiz. pombe* sejteket a borból nehéz eltávolítani, így a borban nem kívánatos minőségi elváltozásokat okozhatnak. Ezen akadály kiküszöbölésére rögzített sejtes rendszerben vizsgáltam egy *suaI<sup>-</sup>* mutáns almasavbontását, illetve kén-hidrogén termelését. Szerves és szervetlen kénforrást tartalmazó tápközegben kimutattam, hogy a mutánsok a vad törzsekkel ellentétben nem termeltek mérhető mennyiségű kén-hidrogént. Az almasavbontó képességben és a bor aromaspektrumának változásában nem volt kimutatható különbség a mutáns és a vad típusú törzsek között.

#### **Az eredmények továbbfejlesztési és hasznosítási lehetőségei**

- Olyan *Schiz. pombe* klónozó vektorok készítése, amelyek szelekciós markerként csak az *suaI* gént tartalmazzák. Ezek a vektorok használhatók lehetnének *Schiz. pombe* génbankok készítésénél is.
- Az *suaI* gén promóter részének és az enzim szubsztrátkötésben szerepet játszó motívumainak további jellemzése.
- Az *suaI<sup>-</sup>* mutáns törzsek jól bontották az almasavat és nem termeltek mérhető mennyiségű kén-hidrogént, ezért ezeket a törzseket a borászatban magas almasavtartalmú borok L-almasavtartalmának a csökkentésére lehetne alkalmazni.
- A borászatban rögzített sejtes *suaI<sup>-</sup>* mutánsok alkalmazása javasolandó, ugyanis a rögzített sejtek a szabad sejtekkel ellentétben jobban bontották az L-almasavat és a borból való eltávolításuk is könnyebben megoldható. Mivel a sejtek rögzítése költséges, ezért flokuláló *suaI<sup>-</sup>* mutánsok izolálásával ez a lépés is leegyszerűsíthető. A borászati alkalmazhatóságot laboratóriumi, félüzemi, majd üzemi léptékben szükséges vizsgálni.

## 8 SUMMARY

For all microorganism, the biosynthesis of sulphur amino acids first requires the capacity to accumulate sulphur atoms and then the transformation of the transported ligands into the sulphide. Yeasts has evolved a large number of both tranpost and biochemical enzyme systems that permit to use a wide variety of inorganis as well as organic sulphur sources. For yeasts sulphate is the main inorganic sulphur source, it is one of the most frequently occuring anion in the environment.

One of the most intensively studied yeast is *Schizosaccharomyces pombe*. Although much is known about its physiology and genetics, its sulphur metabolism is unclear. Until the beginning of my research work not any genes playing a role in sulphate metabolism has been described. During my work a research group from Bern (Schweingruber et al.) published 4 genes (*SAMI*, *MET25*, *MET9*, *MET11*) catalising the incorporation of sulphur into organic molecules. Kohli et al. (1975) isolated 5 methionine auxotrophic strains (*met1-met5*) and mapped by classical way into the chromosomes.

Using selenate-resistant/sulphate non-utilizing strains our group managed to prove that *Schiz. pombe* is able to transform methionine into cysteine by degradation of methionine to sulphate and then it forms cysteine from the sulphate through the sulphate reduction pathway. Therefore the selenate resistant/sulphate non-utilizing mutants having defects in any steps of the sulphate assimilation cannot utilize methionine as sole sulphur source.

The main goal of my PhD thesis was to characterize selenate-resistant/sulphate non-utilizing strains and then to investigate the hydrogen-sulphide production of the wild type and selenate-resistant mutant strains in an immobilized cells system.

In the beginning of my work I fused a selenate-resistant/sulphate non-utilizing mutant and a transformable *ura4* mutation-containing strain. Selenate-resistant, uracil auxotroph recombinant strain was isolated on benomyl-containing medium, which was suitable for transformation by a vector containing the *ura4* prototrophic gene as a selection marker. In *Schiz. pombe* the most frequently used high-efficiency transformation method is the lithium-acetate method. Because this method did not resulted sufficient transformation efficiency in the case of the newly isolated strain, I tried the electroporation transformation technique. I developed a high-efficiency electro-transformation method for S 18-82 *ura4*<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2 strain. Before electroporation I disintegrated the cellullar and membrane structure by using different detergents, enzymes or lithium-acetate solution. The best results, which proved to be enough for screening the gene libraries, was 6.10<sup>4</sup> transformants/ $\mu$ g DNA.

The two electro-transformation methods of highest-efficiency were used for screening the three genomic libraries containing DNA inserts of different sizes. Positive transformants were isolated on minimal medium containing sulphate as the sole sulphur source. The complemented gene responsible for sulphate utilization provided suffiecient growth of the transformans. Selenate sensitivities of the transformants were equal to that of the wild type strain. I isolated plasmid from the transformants and then sequenced one of the cloned fragment. By searching for homologous sequences I compared sequence of the cloned DNA with sequences found in BLASTN data base. In the mentioned data base one sequence was found (cosmid 1228) which contained the whole cloned genomic DNA fragment. This cosmid had been sequenced as the part of *Schiz. pombe* "GENOM PROJECT". It is close to the centromere on the left arm of chromosome II.

On the 4.5 kbp long DNA fragment two ORFs were found. It was proved by subcloning that the gene encoding ATP-sulphurylase enzyme is responsible for the selenate-resistant phenotype. This gene was named as *sua1*.

The 1473 bp long *sua1* gene codes for a 440 amino acid containing protein. The start codon is the ATG, encoding for methionine and TAA is the STOP codon. The gene does not contain any introns. In the downstream region gene there is an adenine and thimine rich fragment, the A+T content of the 200 bp long downstream region of the gene is 73 %.

As in other living organisms conservative regions responsible for substrate binding ( $^{190}\text{VxAFQxRNP}$ , “GRD-loop”) can be found in the Sua1p. Before the GRD region one amino acid change can be found, in the position 286 isoleucine is found instead of valin typical to other organisms. The molecular weight of the Sua1p is 54.7 kDa.

The selenate-resistant strain practically had no ATP-sulphurylase activity, but the enzyme activity of positive transformants and the wild type strain were the same.

The *sua1* mutant were transformed with vector containing *sua1* gene as a selection marker. The advantage of using *sua1* gene as a selection marker is that both the host strain and the complemented transformant can be isolated using positive selection, according to selenate-resistance and sulphate-utilization, respectively. By culturing the transformants on non-selective medium plasmid-loss can be quantitatively determined.

The cloned *sua1* gene was transferred to a bifunctional vector and used to transform a *S. cerevisiae met3* mutant. The ATP-sulphurylase gene of *Schiz. pombe* could complement the *S. cerevisiae met3* mutant gene and its termination signal could ensure gene expression.

The first methionine auxotrophic mutants were isolated in 1975 by Kohli et al. I investigated which sulphur sources can be utilized by these methionine mutants. Using these results, map positions of the mutant alleles on the chromosomes as determined by Kohli and the published *Schiz. pombe* genom sequences I concluded that not any is allelic with *sua1* gene. The results showed that in *met1* and *met2* two different homocysteine-methyltransferases, in *met3* the cystathionine- $\gamma$ -synthase, in *met4* mutant the homoserine-O-acetyltransferase and in *met5* the metyl-tetrahydrofolate-reductase gene was inactivated. It is likely that the last one is allelic with the *met9* gene described by Naula et al (2002).

Luca Bánszky in her PhD work investigated the malic acid degradation and H<sub>2</sub>S production ability of selenate-sensitive (wild type) and selenate-resistant strains in free cells system. The disadvantage of the free cells system is that after decreasing the malic acid concentration to the desired level the cells cannot easily be removed from the wine and can cause undesirable quality changes in wine. To avoid this problem I investigated the malic acid degradation and H<sub>2</sub>S production of selenate-sensitive and selenate-resistant strains in immobilized cells system. In organic and inorganic sulphur-containing medium it was proved that mutants did not produce measurable H<sub>2</sub>S in contrast to the wild type strains. The malic acid degradation and the changes in wine aroma spectrum were the same in both cases.

#### **Futher development and utilization of the results**

- Construction of *Schiz. pombe* cloning vectors containing *sua1* gene as the only selection vector. It would be used in preparation of *Schiz. pombe* gene libraries.
- Characterization of the promoter region of the *sua1* gene and the substrate binding region of the encoded protein .
- The *sua1* mutant could degradate malic acid and did not produce detectable H<sub>2</sub>S, therefore it is recommended to use them in wine-making for decreasing the malic acid content of wines.
- In wine-making using of the immobilized cell system is recommended more than free cell system because immobilized cells degraded malic acid better and their removing from wine is easier. As the preparation of immobilized cells is expensive, this step can be simplified by

using flocculent *sua1* mutants. It is necessary to investigate the applicability in wine deacidification in laboratory and semi-pilote, then pilote scale.

## 9 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Sikerült a *Schiz. pombe* gombára kidolgoznom egy nagyhatékonyságú transzformációs eljárást, amely génbank szkrínelésére is használható.
- Elsőként sikerült klónozni és jellemezni a *Schiz. pombe* ATP-szulfuriláz enzimét kódoló gént, amelyet *sua1*-nek neveztem el.
- Az *sua1* génnek szelekciós markerként való alkalmazásával egy olyan vektort sikerült létrehozni, amely kettős pozitív szelekciót tesz lehetővé: mind a szelenát-rezisztens klónozó gazdatörzsek, mind pedig a prototróf transzformánsok pozitívan szelektálhatók, valamint a transzformánsok plazmidvesztése is egyszerűen és mennyiségileg meghatározható.
- Az *sua1* gén *S. cerevisiae*-ben való klónozásával bizonyítottam, hogy a *Schiz. pombe* *sua1* génje képes komplementálni a *S. cerevisiae* *met3* mutánst. Ez az ATP-szulfuriláz gének konzervatív létét mutatja.
- Sikerült megállapítanom, hogy a Kohli és mtsi által leírt metionin auxotróf törzsek egyikében sem az ATP-szulfuriláz gént inaktiválták.
- Kén-hidrogén termelés mérésével bizonyítottam, hogy a szelenát-rezisztens törzsek a vad típusú párjukkal ellentétben sem szerves vagy szervesetlen kénforrást tartalmazó táptalajban, sem pedig borban nem termelnek kimutatható mennyiségben kén-hidrogént.
- Rögzített sejtekkel elvégzett kísérletekkel bizonyítottam, hogy a rögzített sejtek mind szerves vagy szervesetlen kénforrást tartalmazó táptalajban, mind pedig borban jobban bontják az L-almasavat mint a szabad sejtek.

## 10 FELHASZNÁLT IRODALOM

- Alonso, A., Benitez, J., Diaz, M. A. (1984) A sulfate, sulfite and thiosulfate incorporating system in *Candida utilis*. *Folia Micro.* **29** (1), 8-13.
- Ammerer, G., Hitzeman, R., Magie, F., Barta, A., Hall, B. P. (1981) The functional expression of mammalian genes in yeast. In: Walton AG (ed) *Recombinant DNA*. Elsevier, Amsterdam, pp 185-197.
- André, B. (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1575-1611.
- Arst, H. N. (1968) Genetic analysis of the first step of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Nature* **219**, 268-270.
- Backer, M. D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R., Luyten, W. H. M. L. (1999) Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast* **15**, 1609-1618.
- Baker, R. E., Masison D. C. (1990) Isolation of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* centromere binding protein CP1. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2458-2467.
- Bánszky, L., Simonics, T., Maráz, A. (2003) Sulphate metabolism of selenate-resistant *Schizosaccharomyces pombe* mutants. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**, 271-278.
- Barbet, N., Muriel, W. J., Carr, A. M. (1992) Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **114**, 59-66.
- Barton, A. B., Kaback, D. B., Clark, M. W., Keng, T., Quелlette, B. F., Storms, R. K., Zeng, B., Zhong, W., Fortin, N., Delaney, S., Bussey H. (1993) Physical localization of yeast *CYS3*, a gene whose product resembles the rat gamma-cystathionase and *Escherichia coli* cystathionine gamma-synthase enzymes. *Yeast* **9**, 363-369.
- Benkő, Z., Sipiczki, M., and Carr, A. M. (1998) Cloning of *caf1(+)*, *caf2(+)* and *caf4(+)* from *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in multidrug resistance, UV and pH sensitivity. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 434-443.
- Berendt, U., Haverkamp, T., Prior, A., Schwenn, J. D. (1995) Reaction mechanism of thioredoxin: 3'-phospho-adenylylsulfate reductase investigated by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **233**, 347-356.
- Bidan, P., Meyer, J. P., Schaffer, A. (1974) Les *Schizosaccharomyces* en oenologie. *Bull. OIV* **47**, 682-106.
- Borges-Walmsley, M. I., Turner, G., Bailey, A. M., Brown, J., Lehmbeck, J., Clausen, I. G. (1995) Isolation and characterisation of genes for sulphate activation and reduction in *Aspergillus nidulans*: implications for evolution of an allosteric control region by gene duplication. *Mol Gen Genet* **247**, 423-429.
- Breton, A., Surdin-Kerjan, Y. (1977) Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical and genetic study. *J. Bacteriol.* **132**, 224-232.
- Brzywczy, J., Paszewski, A. (1994) Sulphur amino acid metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*: occurrence of two O-acetylhomoserine sulphydrolases and the lack of the reverse transsulphuration pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 171-174.
- Brzywczy, J., Sienko, M., Kucharska, A., Paszewski, A. (2002) Sulphur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulphur metabolism in fungi. *Yeast* **19**, 29-35.
- Burton, E., Selhub, J., Sakami, W. (1969) The substrate specificity of 5'-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine methyltransferase. *Biochem. J.* **111**, 793-795.
- Buxton, F. P., Gwynne, D. I., Davies, R. W. (1989) Cloning of a new bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains. *Gene* **84**, 329-334.

- Cai, M., Davis, R. W. (1990) Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell* **61**, 437-446.
- Chen, Z., Chakraborty, S., Banerjee, R. (1995) Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J. Biol. Chem.* **270**, 19246-19249.
- Cherest H, Eichler, F., de Robichon-Szulmajster, H. (1969) Genetic and regulatory aspects of methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **97**, 328-336.
- Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y., Antoniewski, J., de Robichon-Szulmajster, H. (1973) Effects of regulatory mutations upon methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: loci *eth2-eth3-eth10*. *J. Bacteriol.* **115**, 1084-1093.
- Cherest, H., Nguyen, N. T., Surdin-Kerjan, Y. (1985) Transcriptional regulation of the *MET3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **34**, 269-281.
- Cherest, H., Kerjan, P., Surdin-Kerjan, Y. (1987) The *Saccharomyces cerevisiae MET3* gene: Nucleotide sequence and relationship of the 5' non-coding region to that of *MET25*. *Mol Gen Genet* **210**, 307-313.
- Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y. (1992) Genetics analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* **130**, 51-58.
- Cherest, H., Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y. (1993) Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through the transsulfuration pathway which has been built up by enzyme recruitment. *J. Bacteriol.* **175**, 5366-5374.
- Cherest, H., Davidian, J. C., Thomas, D., Benes, V., Ansorge, W., Surdin-Kerjan, Y. (1997) Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**, 627-635.
- Ciani, M. (1995) Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells: evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. *J. Appl. Bacter.* **79**, 631-634.
- Csaikl, U., Csaikl, F. (1986) Molecular cloning and characterization of the *MET6* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **46**, 207-214.
- Delorme, E. (1989) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2242-2246.
- De Lucas, J. R., Dominguez, A. I., Higuero, Y., Martinez, O., Romero, B., Mendoza, A., Garcia-Bustos, J. F., Laborda, F. (2001) Development of a homologous transformation system for the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus* based on the *sC* gene encoding ATP sulphurylase. *Arch. Microbiol.* **176**, 106-113.
- De Meio, R. M. (1975) Sulfate activation and transfer, p. 287-358. In D. M. Greenberg (ed.), *Metabolic pathway*, vol. VII. Academic Press, Inc., New York, N. Y.
- Dénarié, J., Debellé, F., Rosenberg, C. (1992) Signalling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 497-531.
- Deyrup, A. T., Krishnan, S., Singh, B., Schwartz, N. B. (1999) Activity and stability of recombinant bifunctional rearranged and monofunctional domains of ATP-sulfurylase and adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *Biochemistry* **38**, 6311-6316.
- Dittrich, H. H. (1963) Zum chemismus des apfelsäureabbaues mit einer hefe der gattung *Schizosaccharomyces*. *Wein-Wiss* **18**, 406-411.
- Eichel, J., Gonzalez, J. C., Hotze, M., Matthews, R. G., Schroder, J. (1995) Vitamin-B<sub>12</sub>-independent methionine synthase from a higher plant (*Catharanthus roseus*). Molecular characterization, regulation, heterologous expression, and enzyme properties. *Eur. J. Biochem.* **230**, 1053-1058.



- Ethiraj, S., Suresh, E. R., Onkaraya, H. (1983) Controlled deacidification of Bangalore blue grape must with *Schizosaccharomyces pombe*. J Food Sci. Technol., **20**, 248-250.
- Faber, K. N., Haima, P., Harder, W., Veenhuis, M. (1993) Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. Curr. Genet. **25**, 305-310.
- Fitzgerald-Hayes, M., Buhler, J. M., Cooper, T. G., Carbon, J. (1982) Isolation and subcloning analysis of functional centromere DNA (*CEN11*) from *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XI. Mol. Cell. Biol. **2**, 82-87.
- Flavin, M. (1975) Methionine biosynthesis, p. 457-503. In D. M. Greeberg (ed.) Metabolic pathways, vol. VII. Academic Press, Inc., New York, N. Y.
- Foster, B. A., Thomas, S. M., Mahr, J. A., Renosto, F., Patel, H. C., Segel, I. H. (1994) Cloning and sequencing of ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. J. Biol. Chem. **269**, 19777-19786.
- Fuck, E., Radler, F. (1972) Äpfelsaurestoffwechsler bei *Saccharomyces* I. Der anaerobe Äpfelsaureabbau von *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. **87**, 149-164.
- Gallander, J. F. (1977) Deacidification of eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. Am. J. Enol. Vitic. **28**, 65-68.
- Gharieb, M. M., Wilkinson, S. C., Gadd, G. M. (1995) Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphism and filamentous fungi: cellular location of reduced selenium and implications for tolerance. J. Ind. Microbiol. **14**, 300-311.
- Gutierrez-Marcos, J. F., Roberts, M. A., Campbell, E. I., Wray, J. L. (1996) Three members of a novel small family from *Arabidopsis thaliana* able to complement functionally an *Escherichia coli* mutant defective in PAPS reductase activity encode proteins with a thioredoxin-like domain and APS reductase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 13377-13382.
- Hawes, C. S., Nicholas, D. (1973) Adenosine 5'-triphosphate sulphurylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. **133**, 541-550.
- Hill, D. E., Hope, I. A., Macke, J. B., Struhl, K. (1986) Saturation mutagenesis of the yeast HIS3 regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. Science **234**, 451-457.
- Hill, D. E. (1989) Integrative transformation of yeast using electroporation. Nucleic Acids Res. **17** (19), 8011.
- Hilti, N., Gräub, R., Jörg, M., Arnold, P., Schweingruber, A., Schweingruber, M. E. (2000) Gene *saml* encoding adenosylmethionine synthetase: effects of its expression in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast **16**, 1-10.
- Hinnebush, A. G. (1992) General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*, p 319-414. In E. W. Jones, J. R. Pringle and J. R. Broach (ed.), The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Ishikawa, J., Hotta, K. (1999) FramePlot: a new implementation of the Frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. FEMS Microbiol Lett. **174** (2), 251-253.
- Isnard, A. D., Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y. (1996) The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. J. Mol. Biol. **262**, 473-484.
- Jakubowski, H., Goldman, E. (1993) Methionine-mediated lethality in yeast cells at elevated temperature. J. Bacteriol. **175**, 5469-5476.
- Jiranek, V., Landgride, P., Henschke, P. A. (1995) Regulation of Hydrogen Sulfide Liberation in Wine-Producing *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Assimilable Nitrogen. Applied and Enviro. Microbiology **61** (2), 461-467.

Jones, E. W., Fink, G. R. (1982) Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast, p. 181-299. In J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach (ed.) The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Kasuske, A., Wedler, H., Schulze, S., Becher, D. (1992) Efficient electropulse transformation of intact *Candida maltosa* cells by different homologous vector plasmids. *Yeast* **8**, 691-697.

Kellog, W. W., Cadle, R. D., Allen, E. R., Lazrus, A. L., Martell, E. A. (1972) The sulfur cycle. *Science* **175**, 587-595.

Ketter, J. S., Jarai, G., Fu, Y. H., Marzluf, G. A. (1991) Nucleotide sequence, messenger RNA stability and DNA recognition elements of *cys-14*, the structural gene for sulfate permease II in *Neurospora crassa*. *Biochemistry* **30**, 1780-1787.

Klonus, D., Hofgen, R., Willmitzer, L., Riesmeier, J. W. (1994) Isolation and characterization of two cDNA clones encoding ATP-sulfurylase from potato by complementation of a yeast mutant. *Plant J.* **6**, 105-112.

Kobayashi, K., Yoshimoto, A. (1982a) Studies on yeast sulfite reductase. IV. Structure and steady-state kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* **705**, 348-356.

Kobayashi, K., Yoshimoto, A. (1982b) Studies on yeast sulfite reductase. V. Effects of ionic strength on enzyme activities. *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 38-45.

Kohli, J., Hottinger, H., Munz, P., Strauss, A., Thuriaux, P. (1977) Genetic mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization. *Genetics* **87**, 471-489.

Kondo, K., Saito, T., Kajiwara, S., Takagi, M., Misawa, N. (1995) A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *J. Bacteriol.* **177**, 7171-7177.

Korch, C., Mountain, A. H., Byström, A. S. (1991) Cloning, nucleotide sequence and regulation of *MET14*, the gene encoding the APS kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 96-108.

Kozak, M. (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5233-5252.

Kruger, W. D., Cox, D. R. (1994) A yeast system for expression of human cystathionine beta-synthase: structural and functional conservation of the human and yeast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6614-6618.

Kuras, L., Thomas, D. (1995) Identification of the yeast methionine biosynthetic genes that require the centromere factor I for their transcriptional activation. *FEBS Lett.* **367**, 15-18.

Kuras, L., Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D. (1996) A heteromeric complex containing the centromere binding factor 1 and two basic leucine zipper factors, Met4 and Met28, mediates the transcription activation of yeast sulfur metabolism. *EMBO J.* **15**, 2519-2529.

Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764.

Lauchi, A. (1993) Selenium in plants: uptake, functions and environmental toxicity. *Bot. Acta* **106**, 455-468.

Leustek, T., Murillo, M., Cervantes, M. (1994) Cloning of a cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **105**, 897-902.

Leyh, T. S., Suo, Y. (1992) GTPase-mediated activation of ATP sulfurylase. *J. Biol. Chem.* **267**, 542-545.

- Leyh, T. S., Vogt, T. F., Suo, Y. (1992) The DNA sequence of the sulfate activation locus from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **267**, 10405-10410.
- Li, H., Deyrup, A., Jr. Mensch, J. R., Domowicz, M., Konstantinidis, A. K., Schwartz, N. B. (1995) The isolation and characterization of cDNA encoding the mouse bifunctional ATP sulfurylase-adenosine 5'-phospho-sulfate kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 29453-29459.
- Li, Q., Marzluf, G. A. (1996) Determination of the *Neurospora crassa* CYS3 sulfur regulatory protein consensus DNA-binding site: amino acid substitutions in the CYS3 bZip domain that alter DNA-binding specificity. *Curr. Genet.* **30**, 298-304.
- Liu, C., Suo, Y., Leyh, T. S. (1994) The energetic linkage of GTP hydrolysis and the synthesis of activated sulfate. *Biochemistry* **33**, 7309-7314.
- Logan, H. M., Cathala, N., Grignon, C., Davidian, J. C. (1996) Cloning of a cDNA encoded by a member of the *Arabidopsis thaliana* ATP sulfurylase multigene family. *J. Biol. Chem.* **271**, 12227-12233.
- Lyle, S., Stanczak, J., Ng, K., Schwartz, N. B. (1994) Rat chondrosarcoma ATP sulfurylase and adenosine 5'-phosphosulfate kinase reside on a single bifunctional protein. *Biochemistry* **33**, 5920-5925.
- Magyar, I., Panyik, I. (1989) Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. *Am. J. Enol. Vitic.* **40**, 233-240.
- Mao, X., Hu, Z., Liang, Ch., Lu, Ch. (2002) MET3 promoter: a tightly regulated promoter and its application in construction of conditional lethal strain. *Curr. Microbiol.* **45**, 37-40.
- Marcis, B. J., Markakis, P. (1974) Transport and toxicity of sulfur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoidus*. *J. Sci. Food Agric.* **25**, 21-29.
- Martin, R. L., Daley, L.A., Lovric, Z., Wailes, L. M., Renosto, F. (1989) The „regulatory” sulfhydryl group of *Penicillium chrysogenum* ATP sulfurylase. *J. Biol. Chem.* **264**, 11768-75.
- Marzluf, G. A. (1970) Genetic and biochemical studies of distinct sulfate permease species in different developmental stages of *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **138**, 254-263.
- Marzluf, G. A., Metzberg, R. L. (1968) Positive control by the CYS3 locus in regulation of sulfur metabolism in *Neurospora*. *J. Mol. Biol.* **33**, 423-437.
- Marzluf, G. A. (1974) Uptake and efflux of sulfate in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 374-381.
- Marzluf, G.A. (1997) Molecular genetics of sulphur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Ann. Rev. Microbiol.* **51**, 73-96.
- Masselot, M., Surdin-Kerjan, Y. (1977) Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway. *Mol. Gen. Genet.* **154**, 23-30.
- Mayer, K., Temperli, A. (1963) The metabolism of l-malate and others compounds by *Schizosaccharomyces pombe*. *Archiv. Mikrobiol.* **46**, 321-328.
- Mellor, J., Jiang, W., Funk, M., Rathjen, J., Barnes, J. C., Hinz, T., Hegemann, J. H., Philippsen, P. (1990) CBF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters. *EMBO J.* **9**, 4017-4026.
- Mortimer, R. K., Contopoulou, C.R., King, J. S. (1992) Genetics and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **8**, 817-902.
- Mountain, H. A., Byström, A. S., Tang Larsen, J., Korch, C. (1991) Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 781-803.

- Murphy, J. T., Spence, K. D. (1972) Transport of S-adenosylmethionine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **109**, 499-504.
- Naula, N., Walther, C., Baumann, D., Ernst Schweingruber, M. (2002) Two non-complementing genes encoding enzymatically active methylenetetrahydrofolate reductases control methionine requirement in fission yeast *Schizosaccharomycetes pombe*. *Yeast* **19**, 841-848.
- 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 trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research* **18**, 6485-6489.
- Old, I. G., Phillips, S. E., Stockley, P. G., Saint Girons, I. (1991) Regulation of methionine biosynthesis in the Enterobacteriaceae. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **56**, 145-185.
- Omura, F., Shibano, Y. (1995) Reduction of hydrogen sulfide production in brewing yeast by constitutive expression of *MET25* gene. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 58-62.
- Ono, B., Shirahige, Y., Nanjoh, A., Andou, N., Ohue, H., Ishino-Arao, Y. (1988) Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mutation that confers cystathionine beta-synthase deficiency. *J. Bacteriol.* **170**, 5883-5889.
- Ono, B., Naito, K. (1991) The cysteine transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 849-855.
- Ono, B., Heike, C., Yano, Y., Inoune, T., Naito, K., Nakagami, S., Yamane, A. (1992) Cloning and mapping of the *CYS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **21**, 285-289.
- Ono, B., Kijima, K., Inoune, T., Naito, K., Miyoshi, S., Matsuda, A., Shinoda, S. (1994) Purification and properties of *Saccharomyces cerevisiae* cystathionine beta-synthase. *Yeast* **10**, 333-339.
- Ostrowski, J., Wu, J. Y., Rueger, D. C., Miller, B. E., Siegel, L. M., Kredich, N. M. (1989) Characterization of the *cysIIIH* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. DNA sequences of *cysI* and *cysH* and a model for the heme-Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> active center of sulfite reductase hemoprotein based on amino acid homology with spinach nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **264**, 15726-15737.
- Paietta, J. V. (1990) Molecular cloning and analysis of the *scon-2* negative regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5207-5214.
- Peynaud, E. (1984) *Knowing and making wine*. John and Sons, Inc New York, 120-138.
- Pinson, B., Sagot, I., Daignan-Fornier, B. (2000) Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Micro.* **36** (3), 679-687.
- Rankine, B. C. (1964) Hydrogen sulphide production by yeasts. *J. Sci. Fd. Agric.* **15**, 872-877.
- Renosto, F., Martin, R. L., Waile, L. M., Daley, L. A., Segel, I. H. (1990) Regulation of inorganic sulfate activation in filamentous fungi. *J. Biol. Chem.* **265**, 10300-10308.
- Robbins, P. W., Lipmann, F. (1958) Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphosulfate. *J. Biol. Chem.* **233**, 686-690.
- Schierová, M., Linka, M., Pažoutová, S. (2000) Sulfate assimilation in *Aspergillus terreus*: analysis of genes encoding ATP-sulfurylase and PAPS-reductase. *Curr. Genet.* **38**, 126-131.
- Schirch, V., Strong, W. B. (1989) Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 371-380.
- Schriek, U., Schwenn, J. D. (1986) Properties of the purified APS-kinase from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **145**, 32-38.
- Schwedock, J. S., Liu, C., Leyh, T. S., Long, S. R. (1994) Rhizobium meliloti NodP and NodQ form a multifunctional sulfate-activating complex requiring GTP for activity. *J. Bacteriol.* **176**, 7055-7064.

- Schweingruber, A. M., Hilti, N., Edenharter, E., Schweingruber, M. E. (1998) Methionine induces sexual development in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* via a *ste11*-dependent signalling pathway. *J. Bacteriol.* **180**, 6338-6341.
- Schwenn, J. D. (1994) Photosynthetic sulfate reduction. *Z. Naturforsch.* **49c**, 531-539.
- Segel, I. H., Renosto, F., Seubert, P. A. (1987) Sulphate-activating enzymes. *Methods Enzymol.*, **143**, 334-339.
- Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J. P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., Davies, J. P. (2002) Selenate resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify *Sulfr1,2*, a sulphate transporter required for efficient transport of sulphate into roots. *The Plant Journal* **29** (4), 475-486.
- Siegel, L. M. (1975) Biochemistry of the sulphur cycle, p. 217-286. In D. M. Greenberg (ed. ), *Metabolic pathway*, vol. VII. Academic Press, Inc., New York, N. Y.
- Sienko, M., Topczewski, J., Paszewski, A. (1998) Structure and regulation of *cysD*, the homocysteine synthase gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **33** (2), 136-144.
- Simonics, T., Bánszky, L., Maráz, A. (2002) Genetics of sulphate assimilation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Acta Microbiol. Immun. Hung.*, **49**, 287-292.
- Singh, A., Sherman, F. (1974) Characteristics and relationships of mercury-resistant mutants and methionine auxotrophs of yeast. *J. Bacteriol.* **118**, 911-918.
- Smith, F. W., Hawkswford, M. J., Prosser, I. M., Clarkson, D. T. (1995) Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Mol. Gen. Genet.* **247**, 709-15.
- Snow, P. G., Gallander, J. F. (1979) Deacidification of white table wine through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* **30**, 45-48.
- Stiles, J. I., Szostak, A., Wu., R., Consaul, S., Sherman, F. (1981) DNA sequence of a mutation in the leader region of the yeast iso-1-cytochrome c mRNA. *Cell* **25**, 277-284.
- Stratford, M., Rose, A.H. (1986) Transport of sulfur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1-6.
- Taillandier, P., Gilis, M., Strehaiano, P. (1995) Deacidification by *Schizosaccharomyces pombe*: interactions with *Saccharomyces*. *J. Biotechnology* **40**, 199-205.
- Taillandier, P., Strehaiano, P. (1991) The role of malic acid in the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe*: substrate consumption and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 541-543.
- Tezuka, H., Mori, T., Okumura, Y., Kitabatake, K., Tsumura, Y. (1992) Cloning of a gene suppressing hydrogen sulfide production by *Saccharomyces cerevisiae* and its expression in a brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50**, 130-133.
- Thomas, D., Barbey, R., Surdin-Kerjan, Y. (1990) Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Study of the 3'-phosphoadenylylsulfate reductase structural gene. *J. Biol. Chem* **265**, 15518-15524.
- Thomas, D., Jaquemin, I., Surdin-Kerjan, Y. (1992a) *MET4*, a leucine zipper protein, and centromere-binding factor 1 are both required for transcriptional activation of sulfur metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1719-1729.
- Thomas, D., Barbey, R., Henry, D., Surdin-Kerjan, Y. (1992b) Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2021-2028.
- Thomas, D., Kuras, L., Barbey, R., Cherest, H., Blaiseau, P. L., Surdin-Kerjan, Y. (1995) Met30, a yeast transcriptional inhibitor that responds to S-adenosylmethionine, is an essential protein with WD40 repeats. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6526-6534.
- Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y. (1997) Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 503-532.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Ullrich, T. C., Blaesse, M., Huber, R. (2001) Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. *The EMBO J.* **20**, 316-329.

Uria-Nickelsen, M. R., Leadbetter, E. R., Godchaux III, W. (1993) Sulfonate-sulfur assimilation by yeasts resembles that of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**, 73-78.

Venkatachalam, K. V., Fuda, H., Koonin, E. V., Strott, C. A. (1999) Site-selected mutagenesis of a conserved nucleotide binding HXGH motif located in the ATP sulfurylase domain of human bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 2601-2604.

Wiame, J. M., Grenson, M., Arst, H. N. (1985) Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **26**, 1-88.

Wilson, L. G., Asahi, T., Bandurski, R. S. (1961) Yeast sulfate reducing system I. Reducing of sulfate to sulfite. *J. Biol. Chem.* **236**, 1822-1829.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Fritze, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S. J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S. M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V. A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R. R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J. L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S. L., Cerrutti, L., Lowe, T., McCombie, W. R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G. V., Ussery, D., Barrell, B. G., Nurse, P. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415** (6874), 845-848.

Yamagata, S., D'Andrea, R. J., Fujisaki, S., Isaji, M., Nakamura, K. (1993) Cloning and bacterial expression of the *CYS3* gene encoding cystathionine gamma-lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. *J. Bacteriol.* **175**, 4800-4808.

Yang, H. Y. (1973) Deacidification of grape musts with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* **24**, 1-4.

Yang, H. Y. (1975) Effect of sulfur dioxide on the activity of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* **26**, 1-4.

Yokotsuka, K., Otaki, A., Naitoh, A., Tanaka, H. (1993) Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of a high-acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**, 371-377.

Yoshimoto, A., Sato, R. (1968) Studies on yeast sulfite reductase. I. Purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 555-575.

Zaret, K. S., Sherman, F. (1982) DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* **28**, 563-573.

## 11 MELLÉKLET

### Aminosavak rövidítései

Aminosav	Hárombetűs rövidítés	Egybetűs rövidítés
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Aszparagin	Asn	N
Aszparaginsav	Asp	D
Cisztein	Cys	C
Glutaminsav	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glicin	Gly	G
Hisztidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Szerin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofán	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V

### Fajnevek rövidítései:

Rövidítés	Fajnév
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Schiz. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>Asp. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Pen. chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Dr. Maráz Annának, hogy vezetése alatt végezhettem doktori tanulmányomat, valamint a Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék valamennyi munkatársának és azoknak az oktatóknak és kutatóknak, akik mindvégig hasznos tanácsokkal láttak el a munkám során és nem utolsósorban családomnak, akik mindvégig türelemmel támogattak dolgozatom megírásában.