

***A SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***  
**KÉNMETABOLIZMUSÁNAK FIZIOLÓGIAI ÉS**  
**MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA**

**SIMONICS TIBOR**  
doktori értekezés tézisei

Budapest, 2004

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Dr. Fekete András  
egyetemi tanár  
Budapesti Corvinus Egyetem

**Témavezető:** Dr. Maráz Anna  
egyetemi tanár  
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék  
Élelmiszertudományi Kar  
Budapesti Corvinus Egyetem

**A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## 1. Bevezetés

### 1.1. A munka előzményei

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 legtöbb élőlény számára a környezetben legnagyobb mennyiségben előforduló egyik anion, a szulfát jelenti a legfőbb szervetlen kénforrást.

Mint más szervetlen anion, a szulfát is egy specifikus membrán transzport segítségével jut be a sejtbe. A szulfát transzportja energiaigényes 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: először a szulfát ion az ATP-szulfuriláz enzimnek köszönhetően egy ATP molekulához kötődik biszulfát leválása közben. Az így keletkezett 5'-adenilil-szulfát (másnéven 5'-adenozin-foszfo-szulfát=APS) molekulához az APS-kináz enzim egy foszfocsoportot kapcsol, majd a PAPS-reduktáz az újonnan keletkezett 3'-foszfo-5'-adenilil-szulfát (másnéven foszfo-adenozin-foszfo-szulfát=PAPS) molekulát szulfittá redukálja. A szulfit a szulfid-reduktáz hatására egy lépésben szulfiddá redukálódik. A szulfid a különböző mikroorganizmusoknál különböző úton épül be a sejt szerves molekuláiba.

A *S. cerevisiae*-nél a szulfid az O-acetilhomoszerinen keresztül épül be a sejt kéntartalmú aminosavaiba, amelynek során homocisztein keletkezik. A homociszteiből vagy metionin, vagy pedig a cisztationon keresztül cisztein keletkezik. Mivel a ciszteiből az S-adenozil-metioninen keresztül és a metioninből az S-adenozil-homociszteinen keresztül képződhet homocisztein, ezért bármelyik két kéntartalmú aminosav elegendő egyedüli kénforrásként (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

A *Schiz. pombe*-nél a szulfid az O-acetilszerinnel reagál, majd cisztein keletkezik. A cisztein O-acetilhomoszerinnel 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-acetilhomoszerin reakciójából, valamint metioninből S-adenozil-metioninen és S-adenozil-homociszteinen keresztül.

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

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 útban sérült szelenát-rezisztens/szulfátot nem hasznosító törzsek a metionint egyedüli kénforrásként nem képesek hasznosítani (Bánszky és mtsi, 2003).

Sejten belüli kénfelesleg esetén a kén kén-hidrogén formájában kijut a sejtből. Ez a jelenség komoly íz- és aroma problémákat okozhat a sörgyártás, illetve a borászat területén. 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  $\text{CO}_2$  képződik. Manapság a borászatban a malolaktikus fermentáció terjedt el. Ennek az eljárásnak a hátránya,

hogy magas  $\text{SO}_2$  koncentrációnál, alacsony pH-nál, alacsony hőmérsékleten és magas alkohol tartalomnál nem megy végbe, míg a maloetanolos fermentáció alacsony pH-nál és magas  $\text{SO}_2$  koncentrációnál is folyik. A maloetanolos eljárás hátránya viszont, 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. A gyümölcsös íz megtartására megoldást jelentene az ún. rögzített sejtek alkalmazása.

A szulfát asszimilációs út első lépéseinek enzimeit a szulfát toxikus analógjai (pl. szelenát, kromát, molibdenát) is „igénybe veszik“, amelyek bizonyos koncentráció felett a sejtek számára toxikus hatásúak lehetnek. 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) inaktiválódhat (Lauchi, 1993).

Az eukarióta mikroorganizmusoknál a szulfát hasznosítás és a szelenát érzékenység közötti szoros kapcsolatra először 1968-ban Arst mutatott rá *Aspergillus nidulans*-sal végzett kísérletei során. A szulfátot hasznosító törzsek szaporodását a szelenát gátolja, a szulfátot hasznosítani nem képes törzsek viszont szelenát-rezisztenssé váltak. Surdin-Kerjan és csoportja eredményei szerint a *Saccharomyces cerevisiae* szulfát asszimilációs génjeiben sérült összes mutánsa különböző fokú szelenát-rezisztenciával rendelkezik. *Schizosaccharomyces pombe*-nél először kutatócsoportunk izolált majd jellemzett szelenát-érzékeny mutánsokat. 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.

### **1.2. Célkitűzések**

1. 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.
2. A szulfát redukciós út sérült enzimét kódoló gén izolálása, szubklónozása, azonosítása majd jellemzése.
3. A klónozott gén *S. cerevisiae*-ben való kifejeződésének vizsgálata.

4. A klónozott gén szelekciós markerként való felhasználhatóságának vizsgálata klónozó vektor kifejlesztéséhez.
5. Annak vizsgálata, hogy a vad típusú és a szelenát-rezisztens törzsek ATP-szulfuriláz enzimaktivitása és kén-hidrogén termelése változott-e.
6. 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.
7. Rögzített sejtes rendszerben megvizsgálni a szelenát-rezisztens mutánsok borászatban biológiai almasavbontásra való alkalmazhatóságát.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. A vizsgált törzsek

A munkám során használt törzsek:

-*Schiz. pombe* törzsek

a., szelenát-rezisztens törzsek: 0-82 h<sup>-</sup> *ade5<sup>-</sup> Se<sup>R</sup>-2*; B-579

h<sup>-</sup> *Se<sup>R</sup>-2*; 0-121 h<sup>-</sup> *trp1arg1 Se<sup>R</sup>-2*; L-972 h<sup>-</sup> *Se<sup>R</sup>-2*

b., metionin auxotróf törzsek : 3-112 h<sup>-</sup> *met1-1*; 16-

635 h<sup>+</sup> *met2-2*; 3-117 h<sup>+</sup> *met3-1*; 20-763 h<sup>+</sup> *met4-6*; 0-

162 h<sup>-</sup> *met5-1*

c., klónozó törzs: D-18 *ura4<sup>-</sup>*

-*S. cerevisiae* ATP-szulfurilázban sérült törzs: CC371-4B Mato

*his3 leu2 ura3 met3*



## **2.2. A felhasznált plazmidok, génbankok**

A klónozási kísérletekhez a *Schiz. pombe* pUR18N shuttle vektort, és az ezzel kialakított génbankokat használtam. A klónozott génnek *S. cerevisiae*-ben való klónozásához a Yeplac181 autonóm replikációjú vektort használtam.

## **2.3. A kísérleti módszerek rövid bemutatása**

A vizsgálati módszerek kiválasztásánál egyrészt az irodalomban közölt vizsgálati módszereket alkalmaztam, másrészt ezeket továbbfejlesztettem, illetve újakat dolgoztam ki.

A *Schiz. pombe* génbank szűréshez a Benkő Zsigmond és mtsi által készített és publikált (Benkő és mtsi, 1998) génbankokat használtam.

Mivel egyik általunk izolált szelenát-rezisztens törzs sem hozdozta az *ura4* auxotrófia mutációt, ezért első lépésként egy *ura4*, szelenát-rezisztens törzs előállítása volt a cél, amelyet a 0-82 *ade5*<sup>R</sup>-2 és a D-18 *ura4* törzsek protoplaszt fúziója, majd ezt követően benomilt tartalmazó táptalajon való mitotikus szegregáció után izoláltam.

Az irodalomban közölt *Schiz. pombe* transzformációs eljárás nem bizonyult elég hatékonynak, ezért új eljárás kidolgozására volt szükség. A nagyhatékonyságú elektro-transzformációs eljárás kidolgozásánál a következő kezeléseknél kaptam a legnagyobb hatékonyságot: 1., 10 mM ditiotreitolt, 0,1 M lítium-acetát, 100 mM Tris, 5 mM EDTA (pH8,5) 2., 100 µg/mL sejtfalbontó enzim (lysing enzyme, Sigma).

A klónozott DNS szakasz nukleotid sorrendjét Perkin-Elmer automatikus DNS szekvenátor (ABI373 model) segítségével, a dideoxi láncterminációs módszerrel a Szegedi Biológiai Központban határozták meg. A szekvenálás során használt primereket mindig a már megszekvenált DNS szakasz nukleotid sorrendje alapján szintetizáltattam. A szekvenciát a BLASTN, BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a FramePlot 2.3.2. (<http://www.nih.gov/~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.

Mind a *Schiz. pombe*-ben, mind pedig a *S. cerevisiae*-ben történő klónozásnál a plazmid izolálásához az *Escherichia coli*-ban való felszaporítást használtam, amely a *Schiz. pombe* esetében sokkal kisebb hatékonyságúnak bizonyult.

A kén-hidrogén termelés mérés esetében (Jiránek és mtsi, 1995) a tápközegből felszabaduló kén-hidrogént kadmium-hidroxidot tartalmazó csapdába vezettem el. A kén-hidrogén és a kadmium-hidroxid reakciójából felszabaduló kadmium-szulfid mennyiségére a kék színreakció után a kékszín intenzitásából következtettem.

Az ATP-szulfuriláz enzimaktivitás mérésére a Segel és mtsi (1987) által leírt módszert használtam. Ennek a lényege, hogy az ATP-szulfuriláz az ATP molekulából pirofoszfátot szabadít fel, amelyet a pirofoszfátáz enzim tovább hidrolizál. A felszabadult foszfátot színreakcióval mutattam ki, és mennyiségét fotométerrel mértem. A

színreakció stöchiometrikus, így a színképzés arányos az enzimaktivitással.

A rögzített sejtek készítésénél a sejtuszuspenziót 1:3 arányban Na-alginát oldattal összekevertem, majd 0,2 M-os  $\text{CaCl}_2$  oldatba csepegtetve megszilárdítottam. Két óras várakozást követően a rögzített sejteket steril desztillált vízzel átmostam.

A borból illetve az almasav táplevesből kivett minták almasav tartalmát L-almasav teszttel (Boehringer Mannheim) a gyártó utasítása szerint határoztam meg.

### 3. Az eredmények összefoglalása

Munkám elején egy szelenát rezisztens/szulfátot nem hasznosító mutáns (0-82 h<sup>-</sup> *ade5*<sup>-</sup>  $\text{Se}^{\text{R}-2}$ ) és egy *ura4* mutációt hordozó transzformálható törzs (D-18 *ura4*) fúzióját követően benomilos táptalajon szelenát-rezisztens, uracil hiányos rekombináns törzset (S 18-82 *ura4*  $\text{Se}^{\text{R}-2}$ ) izoláltam, amely alkalmas volt *ura4* szelektációs markert hordozó vektorral való transzformációra. A *Schiz. pombe* élesztőgombánál leggyakrabban használatos és legnagyobb hatékonysággal működő transzformációs eljárás a lítium-acetátos transzformáció. Mivel az újonnan izolált törzs esetében nem sikerült elég nagy transzformációs gyakoriságot elérnem, ezért elektroporációval próbálkoztam. A klónozó gazdaként alkalmazni kívánt S 18-82 *ura4*  $\text{Se}^{\text{R}-2}$  törzsre kidolgoztam egy nagyhatékonyságú transzformációs eljárást. Elektroporáció előtt a sejtfal 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/ $\mu\text{g}$  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 genomiális 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 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 *sua1* génnek neveztem el.

Az 1473 bp hosszú *sua1* 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 *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.

Az *Sua1p*-ben megtalálhatók azok a szubsztrát kötésében szerepet játszó konzervatív szekvenciák ( $^{190}\text{VxAFQxRNP}$ , "GRD-loop"), amelyeket más élőlényeknél jellemzett ATP-szulfuriláz enzimek is tartalmaznak. Az *sua1* génnél viszont a GRD szakaszt megelőző aminosavban (V-valin) eltérés figyelhető meg: a legtöbb eukarióta élőlényeknél leírt ATP-szulfuriláz enzimekhez képest az *sua1* génben a 286-os pozícióban valin helyett izoleucin (I) található. Az *sua1* 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 *sua1<sup>-</sup>* mutációt hordozó *Schiz. pombe* törzseket az *sua1* gént tartalmazó vektorral transzformáltam. A transzformáció sikeres volt, ami azt bizonyítja, hogy az *sua1* 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 *sua1* 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 *sua1* 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 kén-hidrogén 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 *sua1* 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.

#### 4. 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 szervetlen kénforrást tartalmazó táptalajban, sem pedig borban nem termelnek kimutatható mennyiségben kén-hidrogént.
- Rögzített sejtekkel elvégzett kísérletekkel bizonyítottam, hogy a rögzített sejtek mind szerves vagy szervetlen kénforrást tartalmazó táptalajban, mind pedig borban jobban bontják az L-almasavat mint a szabad sejtek.



## 5. Az eredmények továbbfejlesztési és hasznosítási lehetőségei

- Olyan *Schiz. pombe* klónozó vektorok készítése, amelyek szelekciós markerként csak az *sua1* gént tartalmazzák. Ezek a vektorok használhatók lehetnének *Schiz. pombe* génbankok készítésénél is.
- Az *sua1* gén promóter részének és az enzim szubsztrátkötésben szerepet játszó motívumainak további jellemzése.
- Az *sua1<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 *sua1<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 *sua1<sup>-</sup>* mutánsok izolálásával ez a lépés is leegyszerűsíthető. A borászati alkalmazhatóságot laboratóriumi, félüzemi, majd üzemi léptékben szükséges vizsgálni.

## 6. Tudományos közlemények

### **Impakt faktoros folyóiratcikkek**

- Simonics T**, Kozovska Z, Michalkova-Papajova D, Delahodde A, Jacq C, Subik J (2000): Isolation and molecular characterization of the carboxy-terminal pdr3 mutants in *S. cerevisiae*. *Curr Genet* 38:248-255
- Bánszky L, **Simonics T**, Maráz A (2003): Sulphate metabolism of selenate-resistant *Schizosaccharomyces pombe* mutants. *J Gen Appl Microbiol* 49:271-278
- Sreedhar AS, Mihaly K, Pato B, Schnaider T, Stetak A, Kis-Petik K, Fidy J, **Simonics T**, Maraz A, Csermely P (2003): Hsp90 inhibition accelerates cell lysis. Anti-Hsp90 ribozyme reveals a complex mechanism of Hsp90 inhibitors involving both superoxide- and Hsp90-dependent events. *J Biol Chem* 278:5231-35240
- Simonics T**, Maráz A: Cloning of the ATP sulphurylase gene of *Schizosaccharomyces pombe* by functional complementation (in press)

### **Impakt faktor nélküli folyóiratcikkek**

- Simonics T**, Bánszky L, Maráz A (2001): A *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgomba kénmetabolizmusának genetikai vizsgálata. Rodosz-tanulmányok II:91-102
- Simonics T**, Bánszky L, Maráz A (2002): Genetics of sulphate assimilation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Acta Microbiol. Hung* 49:287-292

### **Konferenciakiadvány, magyar nyelvű, összefoglaló**

- Simonics T**, Maráz A (2000): High frequency electro-transformation for *Schizosaccharomyces pombe*. Magyar Mikrobiológiai Társaság éves közgyűlése-Keszthely
- Simonics T**, Maráz A (2000): Szulfát hasznosításban szerepet játszó gén klónozása *Schizosaccharomyces pombe*-ben. Lippay-Vas Tudományos Ülésszak
- Simonics T**, Maráz A (2001): Szelenát rezisztens törzsek genetikai vizsgálata *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgombánál. Kempelen Farkas Társaság I. találkozója
- Simonics T** (2001): Almasavbontó élesztőgomba kén hidrogén termelésének vizsgálata. Tavasz Szél-Gödöllő

- Simonics T**, Bánszky L, Maráz A (2001): Genetical analysis of sulphate metabolism of the *Schizosaccharomyces pombe*. RODOSZ II. tudományos konferenciája
- Simonics T**, Maráz A (2001): A *Schizosaccharomyces pombe* szulfát metabolizmusában szerepet játszó gén molekuláris vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság éves közgyűlése- Balatonfüred
- Simonics T**, Bánszky L, Maráz A (2002): A *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgomba ATP szulfuriláz génjének klónozása. Kempelen Farkas Társaság II. találkozója
- Simonics T**, Bánszky L, Maráz A (2002): A *Schizosaccharomyces pombe* szulfát hasznosításának genetikai vizsgálata. Magyar Mikológiai Társaság II. konferenciája-Szeged
- Simonics T**, Bánszky L, Maráz A, Magyar I, Tóth-Márkus M (2002): Szulfát hasznosításban sérült *Schizosaccharomyces pombe* mutánsok malo-etanolos fermentációjának vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság éves közgyűlése-Balatonfüred

**Konferenciakiadvány, nemzetközi konferencia, összefoglaló**

- Simonics T**, Maráz A (2001): Cloning of a *Schizosaccharomyces pombe* gene, having role in sulphate utilization. XXIXth Annual Conference on Yeasts, Smolenice (Szlovákia)
- Simonics T**, Maráz A (2001): Genetic background of sulphate utilization at *Schizosaccharomyces pombe*. XXth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology
- Maráz A, **Simonics T**, Bánszky L, Geleta A (2002): Development of fission yeast strains for wine deacidification. Yeast in food processing-tradition and future. Wroclaw (Lengyelország)
- Maráz A, Bánszky L **Simonics T**, Geleta A (2002): Potential application of fission yeast in biotechnology. Power of microbes in industry and environment-Opatija (Horvátország)
- Simonics T**, Bánszky L, Maráz A (2002): Molecular and physiological characterization of selenate resistant mutant strains of *Schizosaccharomyces pombe*. Power of microbes in industry and environment-Opatija (Horvátország)
- Simonics T**, Bánszky L, Maráz A (2002): Cloning and functional analysis of ATP-sulphurylase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. IUMS konferencia-Párizs