

GOMBAMUTÁNSOK FELDUSÍTÁSÁNAK ÉS IZOLÁLÁSÁNAK

ÚJ MÓDSZERE

Doktori értekezés

Készítette és a József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Karához benyújtja

Sipiczki Mátyás

Készült

a JATE Mikrobiológiai Tanszékén

1975.

B E V E Z E T É S

A növényi és a gombaprotoplasztok - sejtfal nélküli sejtek - előállítása és vizsgálata az intenzívebb kutatások megkezdése óta eltelt alig másfél-két évtized alatt számos tudományterületen rendkívüli jelentőségre tett szert.

Ma már gyakran használt módszernek számít a protoplasztvizsgálat a biokémiában, az élettanban, a genetikában. Leghatékonyabban talán a membrán- és sejtfal-vizsgálatoknál alkalmazzák a protoplasztokat. Rendkívül előnyösen felhasználhatók bizonyos sejtalkotók analizálásánál is, ugyanis a korábban eltávolított falak enyhébb feltérzési módszereket tesznek lehetővé és nem zavarják a vizsgálatoknál a sejtfalkomponensek sem. Számos genetikai kérdés tisztázásához is sokkal jobb objektumnak látszanak, mint az intakt sejtek. Gombasejtek transzformációja, fúziója intakt sejtekkel nem valósítható meg. Továbbá sejtiszervek átültetéséhez is kiváló és egyszerű lehetőségeket nyújthatnak a falmentes sejtek.

Az eltávolított fal regeneráltatása lehetséges, és így a protoplasztokból visszajuthatunk az intakt sejtekhez.

A protoplaszt-állapotban létrehozott változások végeredményben tehát normális állapotú sejtek változásaiként tanulmányozhatók.

A tudományterület rendkívül gyorsan és erőteljesen fejlődik. A már kialakult és a még előre nem látható vonatkozásai a biológiában váratlan és nagy horderejű felismerésekhez vezetnek és vezethetnek még a jövőben.

Kísérleteimben a protoplasztológia egy új alkalmazási területét igyekeztem kidolgozni. Egy olyan, a korábbiaktól eltérő mutáns-dúsitási módszert kíséreltem meg létrehozni, amely a különböző korú sejtek eltérő protoplasztálhatóságán alapul.

Mutánsok izolálása a mikrobiológiai laboratórium gyakori feladatai közé tartozik. A mutáns és vad sejtek közötti különbség általában lehetőséget nyújt valamilyen szelekciós rendszer felépítésére. Bizonyos esetekben ez nagyon egyszerű, például a morfológiai mutánsoknál, amelyek vizuálisan felismerhetők. Nehezebb a helyzet az olyan mutánsoknál, ahol valamilyen élettani vagy biokémiai különbség jelentkezik. Ilyen esetben, mivel a közvetlen vizuális elkülönítés nem lehetséges, olyan szelektív rendszert kell kidolgozni, amely lehetővé teszi a különbség észlelését /pl: különböző összetételű táptalajok/. Ezek a rendszerek néha bonyolultak és munkaigényesek.

A feladat egyszerűsítésére szerencsére gyakran létrehozhatók segítő, úgynevezett dúsitási eljárások, amelyeket a mutagén kezelés és az izolációs folyamat közé iktathatunk. A dúsitási eljárásokkal az /általunk/ keresett, izolálendő mutánsok aránya növelhető meg a többi, ebből a szempontból vad sejt rovására. Ez történhet a vad sejtek szelektív elpusztításával, gátlásával vagy eltávolításával.

A jelenleg használatos dúsitási módszerek közül a gyakorlatban elsősorban az antibiotikumokkal /Moat és Srb, 1957; Snow, 1966; Cook, 1974; MacDonald, 1968; Bal, Balbin és Pieniazek, 1974/, mérgekkel /Megnet, 1965/, szűréssel /Fries, 1947; Woodward, De Zeeuw és Srb, 1954; Catheside, 1954; Takahashi, 1959/ történő dúsitások váltak be. Általában jól alkalmazhatók még a rádióaktívan jelölt tápanyagok szelektív felhasználásán alapuló módszerek /Donkersloot

Mateles, 1968/, az éheztetéses módszerek és az említettek kombinációi az éheztetéses dúsitással /Pontecorvo, Röper, Hemmons, MacDonald és Duffon, 1953; Lester, Gross, 1959; Megnet, 1964/. Valamennyi megoldás változó hatékonysággal és általában csak a gombák egy bizonyos csoportjánál alkalmazható.

Munkám során a gombáknál általánosan használható módszert igyekeztem kidolgozni mutánsok dúsitására. A szelekció megvalósítására csigaenzimet és olyan mikrobiális eredetű enzimeket használtam fel, amelyek a gombák sejtfalát oldják.

A sejtfal lebontása illetve eltávolítása többféle módon történhet. Giaja /1914/ figyelte meg először, hogy az éticsiga - *Helix pomatia* - emésztőnedvei feloldják az élesztők sejtfalát, megfigyelései azonban feledésbe merültek. Jólal később 1967-ben Eddy és Williamson újra csigaenzimhez folyamodtak a sejtfal eltávolítása érdekében. Izotóniás közegben kezelve a sejteket fal nélküli képződményeket, azaz protoplasztokat kaptak. *Schizosaccharomyces pombe*-ből Holter és Ottolenghi /1950/ állított elő elsőként protoplasztot szintén csigaenzimmel. A módszer általánosan bevált és ma is széleskörben használatos. Sajnos csigaenzimmel nem oldható minden gomba sejtfala, vagyis más módszerekre is szükség van. Salton 1955-ben megjelent közleménye óta ismeretes, hogy mikroorganizmusok enzimei is oldják az élesztő sejtfalát. Baktériumoknál hasonló jelenségről 1931-ben számoltak be először /Dubos és Avery, 1931/. Garcia-Mendoza és Villanueva 1952-ben *Streptomyces* által termelt ugynevezett "strepzyme" segítségével állított elő élesztő-protoplasztokat és ezzel számos hasonló módszer számára nyitotta meg az utat.

Protoplasztokat nemcsak enzimes úton lehet előállítani. Nečas 1955-ben mechanikai hatásokkal illetve a sejtfal autolízise útján hozott létre ozmotikusan érzékeny fragmentumokat. Mások a sejtfal szintézis gátlásán alapuló eljárásokkal értek el eredményeket /Hamilton és Calvet, 1964;

Johnson, 1968/.

Az általam kidolgozott enzimes mutánsdúsítási módszer arra a megfigyelésre alapul, hogy a log-fázisú, tehát fiatal sejtek sokkal érzékenyebbek a csigaenzimes kezelésre, mint a stationer-fázisú, tehát öreg sejtek. Erre először Eddy és Williamson 1957-ben, majd Holter és Ottolenghi /1960/ is utalt.

A módszer kialakításánál arra törekedtem, hogy biztosítható legyen a vad és mutáns sejtek olyan fiziológiai "korkülönbsége", amely mellett az enzimek elsősorban a vad sejtek falát bontják. Ha a sejtfalbontás hypotóniás közegben történik, a vad sejtek feltehetőleg elpusztulnak.

A módszert a *Schizosaccharomyces pombe* élesztővel dolgoztam ki, de a tapasztalatok felhasználásával kipróbáltam három további, eltérő falszerkezetű és különbözőképpen: protoplasztálható fajjal is. Ezzel kívántam bizonyítani, hogy a módszer nem csak egy fajra érvényes.

A továbbiakban a módszer hatékonyságának növelését tűztem ki célul. Az enzimkezelés megismétlésével illetve a sejtek 2-desoxyglukózos előkezelésével próbáltam a vad sejtek szelektív pusztítását fokozni. Utóbbi kísérleteim Poole és Lloyd /1973/ azon megfigyelésén alapulnak, hogy az előkezelés növeli a sejtek érzékenységét a csigaenzimmel szemben.

Végül mikrobiális eredetű enzimekkel is kipróbáltam a módszert. Sikeres alkalmazásuk esetén ugyanis a dúsítási eljárás kiterjeszhetővé válik azokra a fajokra is, ahol csigaenzimmel nem lehet a falat szétejteni.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mikroorganizmusok

Schizosaccharomyces pombe L 972 h⁻ /0161/, /University of Texas at Dallas/.

Hasadó élesztő. Sejtfalszerkezete jelentősen eltér a többi élesztőtől. A falban kitin és mannán nem található, a fal fő tömegét β -glukán alkotja, de előfordul galaktomannán, α -glukán is /Bush, Horisberger, Horman, Wursch, 1974/. Csigaenzimmel szemben a többi élesztőhöz képest kevésbé érzékeny és 2-merkaptotannal az érzékenység nem fokozható. A csökkent érzékenység feltehetőleg az α /1 \rightarrow 3/ glukán jelenlétével magyarázható /Bacon, Jones, Farmer és Webley, 1968/. Más élesztőkkel összehasonlítva érzékenyebb a 2-desoxyglukózra /Poole és Lloyd, 1973/. Haploid törzs.

Schizosaccharomyces pombe L 972 ade6h⁻ /0163/, /University of Texas at Dallas/.

Az előző törzsből izolált adeninigényes auxotróf mutáns. Bizonyos adenin-koncentráció mellett piros színű telepeket képez. Haploid törzs.

Geotrichum candidum 0055 /SzMC: Szegedi Mikrobiológiai Gyűjtemény, József Attila Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék/.

Sejtfalszerkezete jól ismert, közepesen protoplasztálható /Sistma és Wouters, 1971/. A csigaenzim hatása 2-merkaptotannal fokozható.

Geotrichum candidum 0136 /SzMC/

Az előző törzsből izolált adeninigényes auxotróf mutáns. Megfelelő adenin-koncentráció mellett piros színű telepeket képez.

Saccharomyces cerevisiae S288c /0425/, /University of California, Berkeley/

Sarjadó élesztő. Csigaenzimre közepesen érzékeny. 2-merkaptóetanollal az érzékenység fokozható. A fíat elsősorban mannánok, glukánok és ezek fehérjékkel alkotott glykoprotein komplexei alkotják. Kis mennyiségben a kitin is megtalálható. /Sentandreu és Northcote, 1968; Stewart és Ballou, 1968; Sentandreu és Elorza, 1973; Manners, Masson és Patterson, 1973; Sentandreu, Elorza és Villanueva, 1975/.

Saccharomyces cerevisiae X 1687-16 C /0426/, /University of California, Berkeley/

Hét tápanyagra nézve auxotróf mutáns. Tápanyagigénye a következő: adenin, leucin, izoleucin, metionin, triptofán, tirozin és lizin. Megfelelő adenin-koncentráció mellett piros színű telepeket képez.

Saccharomyces cerevisiae RXII /0054/, /SzMC/

Tulajdonságai hasonlóak a *Saccharomyces cerevisiae* S288c törzshöz.

Candida albicans CBS 562 /0056/

Sarjadó élesztő. Csigaenzimes kezelésre érzékeny és érzékenysége 2-merkaptóetanollal fokozható. Sejtfal-szerkezete hasonló a *Saccharomyces cerevisiae*ához.

Candida albicans liz⁻ 0144 /SzMC/

Az előző törzsből izolált lizin-igényes auxotróf mutáns. Telepmorfológiája megegyezik a vad törzsszel.

Trichoderma viride CBS /0981/

Streptomyces halstedii 10897 FBUA 1031/0370/

Táptalajok és tápoldatok

T-1: teljes tápoldat

5 g élesztőkivonat /oxid/

5 g glukóz

1000 ml desztillált víz

pH: 6,0, *Schizosaccharomyces pombe* nál 5,5

T-2: teljes táptalaj

5 g élesztőkivonat /oxid/

5 g glukóz

25 g agar

1000 ml desztillált víz

pH: 6,0, *Schizosaccharomyces pombe* nál 5,5

T-3: pirosító hatású teljes táptalaj

2,5 g élesztőkivonat /oxid/

20 g glukóz

25 g agar

1000 ml desztillált víz

pH: 6,0, *Schizosaccharomyces pombe* nál 5,5

Ezen a táptalajon a *Schizosaccharomyces pombe* L 972 $ade6h^-$, a *Geotrichum candidum* 0136 és a *Saccharomyces cerevisiae* X 1687-16 C törzsek piros színű telepeket képeznek.

T-4: minimál tápoldat

5 g $(NH_4)_2SO_4$

1 g KH_2PO_4

0,5 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$

10 g glukóz

1 ml szintetikus vitaminoldat

1000 ml desztillált víz

pH: 6,0, Schizosaccharomyces pombenál 5,5.

Néhány kísérletben a glukóz és $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ mennyiségét változtattam. Az eltéréseket a módszerek leírásánál mindig feltüntettem.

A szintetikus vitaminoldatot J. P. van der Walt szerint állítottam össze.

T-5: minimál táptalaj

T-4 tápoldat 25 g agarral kiegészítve.

Enzimkészítmények

Csigaenzim: A vizsgálatok során felhasznált enzimtartalmú kivonatot *Helix pomatia*-ból nyertem. Két napig éheztetett csigák tápláléktól megtisztult gyomrát kiemeltem és azt megnyitva a gastrális folyadékot hűtött edényben összegyűjtöttem. Az így nyert oldat szárazanyag-tartalma körülbelül 14-16 % volt. A szennyező alakos elemeket centrifugálással eltávolítottam, a preparátumot liofileztem, elporítottam és felhasználásig hűtőszekrényben tároltam. A kísérletekben további tisztítás nélkül ezt az enzimtartalmú készítményt használtam fel.

Trichoderma-enzim: *Trichoderma viride* indukciójával állítottam elő a sejtfalbontó aktivitással rendelkező fermentlevet. *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h⁻ T-1 tápoldaton rázatva nevelt 48 órás tenyészetének a sejtjeit centrifugálással összegyűjtöttem és glukózt nem tartalmazó T-4 tápoldatba vittem. 1 g nedves sejtcentrifugátumot adtam 100 ml tápoldathoz. A szusz-

penziót 15 ml-enként Kolle-csészékbe osztottam szét és autoklávban sterilizáltam. Kihűlés után a csészéket *Trichoderma viride* pár napos ferde tenyészetéről vett konidiumokkal oltottam be. Ezután 4 napos inkubáció következett 30 C^o-on. A 3. napon a szuszpenzió feltisztult, az élesztősejtek szétestek. Negyedik napon a fermentlevet összegyűjtöttem és kétszeri centrifugálással eltávolítottam a *Trichoderma* sejteket és az esetleges törmeléket. A fermentlevet 10 ml-es edényekbe töltöttem, megfagyasztottam és fagyasztott állapotban tároltam. Felhasználás előtt a szükséges mennyiséget felolvasztottam és további tisztítás nélkül használtam fel protoplasztképzésre. A fermentlé többszöri fagyasztás és olvasztás után is megőrizte aktivitását.

Streptomyces-enzim: *Streptomyces halstedii* törzse inkubációjával állítottam elő a sejtfalbontó aktivitással rendelkező fermentlevet. *Saccharomyces cerevisiae* RXII T-1 tápoldatban rázatva nevelt 48 órás tenyészetének a sejtjeit centrifugálással összegyűjtöttem és glükózt nem tartalmazó T-4 tápoldatba vittem. 2,5 g nedves sejtcentrifugátumot adtam 100 ml tápoldathoz. A szuszpenziót 25 ml-ként 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokba osztottam szét és autoklávban sterilizáltam. Kihűlés után a lombikokat *Streptomyces halstedii* pár napos ferde tenyészetéről vett inokulummal oltottam be. Ezután 4 napos inkubáció következett rázógépen 20-25 C^o-on. A 3. napon a szuszpenzió általában feltisztult, de a tisztulás a 4. napon sem volt teljes. A 4. napon a fermentlevet összegyűjtöttem és kétszeri centrifugálással eltávolítottam a *Streptomyces* sejteket és az esetleges törmeléket. A fermentlevet minden esetben azonnal felhasználtam további tisztítás nélkül.

Egyéb anyagok és eszközök

2-merkaptoetanol /Reanal/

2-desoxyglukóz /Nutritional Biochemicals Corporation/
A továbbiakban DG.

Aminosavak és szerves bázisok

L-glutamin, L-glutaminsav, L-aszparagin, DL-aszparagin-sav, L-arginin, DL-szerin, DL-fenilalanin, DL-triptofán, L-lizin, DL-leucin, DL-alanin, DL-valin, L-cisztein, L-treonin, L-prolin, L-hisztidin, glicin, L-tirozin, L-metionin, adenin, guanin, uracil, valamennyi Reanal termék és timin, Merck termék.

Philips TUW 15 W lámpa
mutagén kezeléshez.

Módszerek

1. Csigaenzim hatása a *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h⁻ különböző korú tenyészetek sejtjeire:
14-16 óras T-1 tápoldatban rázatva inkubált és 5 napos ferde *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h⁻ tenyészetek sejtjeiből külön-külön 10⁵ sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettem desztillált vízben /pH=6,00/.
A kétféle szuszpenzióhoz 2 % csigaenzimet mértem és 3 órán keresztül kezeltem a sejteket szobahőmérsékleten, miközben időnkénti felrázással szuszpenzióban tartottam őket. Az enzimkezelés előtt, majd a kezelés megkezdése után időnként mintát vettem. A mintákat desztillált vízben hígítottam és T-2 táptalajt tartalmazó Petri-csészékben a táptalaj felületére szélesztettem.

A higitással biztosítottam azt, hogy a csészéken értékelhető telepszám jelenjen meg, illetve a csészékre minél higabb enzimoldat kerüljön. A csészéket 72 órán keresztül 30 C^o-on inkubáltam, majd a megjelenő telepeket összeszámoltam. Mivel az enzimkezelés hypotóniás közegben történt, ahol a protoplasztok szétesnek, telepeket csak az enzimmel szemben ellenálló sejtek képezhettek. Az egyes kísérletek eredményeit átlagoltam és kiszámítottam az átlag szórását /standard hiba/ a következő összefüggés alapján:

$$Sx = \sqrt{\frac{\sum /x-\bar{x}/^2}{n/n-1/}}$$

A továbbiakban is ennek az összefüggésnek az alapján számoltam ki a szórás-értékeket.

2. A mutánsdúsítás optimális körülményeinek meghatározása modellek segítségével:

A/ modellek kidolgozása és kipróbálása:

Mutagén kezelés után a túlélő sejtek szuszpenziójában mindig keverve található a vad és mutáns sejtek. Dúsításkor a vad sejteket úgy kell elpusztítani, hogy közben [~]mutáns sejtek életben maradjanak. A vad sejtek szelektív elpusztítását biztosító körülményeket olyan mesterséges rendszerek segítségével határoztam meg, amelyek a mutagén kezelés utáni állapotokat utánozták. A modellekben a vad és mutáns sejteket 1:1 illetve 100:1 arányban kevertem össze és a keverékből igyekeztem szelektíven elpusztítani a vad sejteket. A mutáns sejtek a *Schizosaccharomyces pombe* L 972 ade6h⁻ adeninigényes törzs sejtjei voltak. Ez a mutáns piros telepeket képez szemben a vad fehér telepeivel, így a kétféle telepek vizuálisan is elkülöníthetők. Az általam alkalmazott modelle

hasonlít Moat, Peters és Srb /1959/ modelljéhez. Szintén fehér vad és piros telepeket képző adeninigényes mutánsok keverékével dolgoztak.

Mind a vad mind a mutáns sejtekből szuszpenziót készítettem és a sejteket Petri-csészékben T-3 táptalaj felületére szélesztettem olyan higitásban, hogy különálló telepek jöjjenek létre. A vad és mutáns sejtek aránya részben 1:1 részben 100:1 volt. A csészéket 5 napig 30 C^o-on inkubáltam, majd a megjelenő telepeket desztillált vízzel lemostam. Lemosás után a kétféle szuszpenzióból külön-külön annyi sejtet vittem be T-4 tápoldatba, hogy a végső koncentráció 10⁵ sejt/ml legyen, majd a sejteket is tartalmazó tápoldatból 250 ml-es talpas gömblombikokba töltöttem 20-20 ml-t. A lombikokba bemértem a 2 %-nak megfelelő csigaenzimet és 30 C^o-on rázatva inkubáltam a sejteket 24 órán keresztül. Az enzim bemérése előtt, majd azt követően 3 óránként mintát vettem és megfelelő higitás után a mintákat T-3 táptalaj felületén szélesztettem. 72 órás inkubáció után a megjelent piros és fehér telepeket összeszámoltam.

B/az enzimkezelés időpontjának kiválasztása:

Az alábbiakban arra kerestem a választ, hogy mennyi időnek kell eltelnie a mutagén kezelés és az enzimes kezelés megkezdése között? A kísérleteket 100:1 vad mutáns arányú modellel végeztem el. A sejteket T-3 táptalaj felületére szélesztettem, majd a csészéket 30 C^o-on inkubáltam különböző ideig. Az inkubációs idő 2, 3, 4 illetve 5 nap volt. A megfelelő inkubációs idő elteltével a csészéket desztillált vízzel lemostam és a szuszpenziót T-4 tápoldatba vittem úgy, hogy a végső koncentráció 10⁵ sejt/ml legyen. A továbbiakban a 2/A fejezetben leírt eljárást követtem.

C/ az enzímkezelés időtartamának és körülményeinek a meghatározása:

A vad és mutáns sejteket 1:1 arányban T-3 táptalaj felületére szélesztettem a már ismert módon. 4 napos 30 C⁰-os inkubáció után a telepeket desztillált vízzel lemostam és a szuszpenziót T-4 tápoldatba vittem úgy, hogy a végső koncentráció 10⁵ sejt/ml legyen. A sejteket is tartalmazó tápoldatból 20-20 ml-t 250 ml-es talpas gömbloblikokba mértem. Az egyik lombikba azonnal bemértem a 2 %-nak megfelelő csigaenzimet a másikba azonban 6 órával később. Az enzímkezelés 30 C⁰-on és rázott tenyészetben történt. Az enzím bemérése előtt illetve azt követően 3 óránként mintát vettem. A mintákat megfelelően hígítva T-3 táptalaj felületére szélesztettem. 72 óra 30 C⁰-on történt inkubálás után összeszámoltam a fehér és piros telepeket.

D/ A kidolgozott módszer hatékonyságának megállapítása:

A 2/A, 2/B és 2/C fejezetekben tapasztaltak alapján a vad és mutáns sejtek 100:1 arányú keverékének szélesztését követően a Petri-csészéket 4 napig inkubáltam, majd a telepeket lemostam és a sejteket T-4 táptalajban inkubáltam 6 órán keresztül. Ezt 6 órás enzímkezelés követte. A csészék lemosása és az enzímkezelés után mintát vettem és a mintákat az ismert módon értékeltem.

A modellkísérletet 16-szor megismételtem és kiszámítottam a mutáns átlagos dúsulását.

3. Auxotróf mutánsok dúsítása *Schizosaccharomyces pombe* élesztőből csigaenzimes kezeléssel:

14-16 órás T-1 tápoldatban 30 C⁰-on rázatva nevelt *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h⁻ tenyészet sejtjeit centrifugálással összegyűjtöttem, majd desztillált vízben felszuszpendáltam. A sejteket T-2 táptalaj

felületére szélesztettem. A sejtezám Petri-csészénként 10^4 volt. A sejteket ezután UV-sugárzással kezeltem /450 erg/mm² ; 1 % túlélés/. A csészéket 4 napon keresztül 30 C^o-on inkubáltam, majd a megjelenő telepeket desztillált vízzel lemostam és T-4 tápoldatba vittem. A végső koncentráció 10^5 sejt/ml volt. A szuszpenzióból 20 ml-t talpas gömblombikba mértem. Ezt 6 órás inkubáció követte 30 C^o-on rázatva, majd bemértem a 2 %-nak megfelelő enzimet. Ujabb 6 óra elteltével mintát vettem és az ismert módon T-2 táptalajra szélesztettem. Korábban, a Petri-csészék lemosását követően is mintát vettem, hogy a dúsulás mértékét meghatározhassam. Mintegy 72 órás inkubálás után a megjelenő telepeket T-5 táptalajra vittem replika-módszerrel /Lederberg és Lederberg, 1952/. Ujabb 48 órai inkubáció után a T-5 táptalajon nem szaporodó mutáns és a szaporodó vad telepeket össze számoltam. Valamennyi mutáns telepet külön-külön izoláltam és meghatároztam a tápanyagigényét.

Mutáns törzsek tápanyagigényének a meghatározása:

Húsz aminosav és négy szerves bázis szempontjából vizsgáltam meg az összes izolált telepet. A 24 vegyületet hat csoportba osztottam úgy, hogy minden csoportba 4-4 anyag került. Az azonos csoportba tartozó vegyületeket összekeverve oldottam fel. Az oldathoz utólag 25 %-nak megfelelő etanolt is hozzámértem a sterilitás biztosítása érdekében. Az egyes vegyületekből külön-külön is készítettem oldatot. A koncentráció mindenhol 0,5 mg/ml volt. A megvizsgálendő klón sejtjeiből szuszpenziót készítettem kb. 10^6 sejt/ml koncentrációban. A szuszpenziót T-5 táptalajt tartalmazó Petri-csészék felületére öntöttem. Néhány másodpercnyi várakozás után a szuszpenziót leöntöttem a csészékről és megszáritottam a táptalaj felületét. A száraz felületre ezután egymástól mintegy 3 cm távolságban hatszög alakban 6 szűrőpapír-

korongot helyeztem. Az egyes korongok a 6 csoport valamelyikével voltak átítatva. Mintegy 3-4 napos inkubáció után a korongok valamelyikénél esetleg két vagy több korong között növekedési zóna jelent meg. Természetesen csak akkor, ha a mutáns a 24 anyag között megtalálta az igényének megfelelőt, vagy megfelelőket. Második lépésben egy újabb Petri-csészén a növekedést okozó csoport egyes vegyületeivel átítatott korongokat raktam fel. Újabb 3-4 napos inkubáció után a növekedési zóna alapján azonosítottam a mutáns tápanyagigényét. Az azonos Petri-csészéről izolált és azonos tápanyagigényt mutató telepeket azonos mutáns telepeinek tekintettem.

4. Magas hőmérsékletre érzékeny mutánsok dúsitása *Schizosaccharomyces pombe* élesztőből csigaenzimes kezeléssel:
- A *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h⁻ törzs 38 C^o-on és ennél magasabb hőmérsékleten már nem szaporodik. 35 C^o-on a növekedés és a szaporodás közel optimális. Kísérleteim során olyan mutánsokat dúsitottam, amelyek 35 C^o-on már nem növekednek, de ennél alacsonyabb hőmérsékleten, például 25 C^o-on szabályos növekedést és szaporodást mutatnak. A fiatal tenyészet sejtjeit a 3. fejezetben leírt módon mutagén kezelésnek tettem ki. A Petri-csészéket ezután 7 napon keresztül 25 C^o-on inkubáltam, majd a megjelent telepeket desztillált vízzel lemostam. A sejteket T-1 tápoldatba vittem úgy, hogy a végső koncentráció 10⁵ sejt/ml legyen. A szuszpenzióból 20-20 ml-t 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokba töltöttem. A lombikokat ezután Vibroterm rázógépen 35 C^o-on inkubáltam. 6 óra elteltével minden lombikba annyi enzimet mértem, hogy a végső koncentráció 2 % legyen. Újabb 6 óra elteltével az enzimekezelést befejeztem. Induláskor és 12 órával később, az enzimekezelés után mintát vettem és megfelelő higitás elvégzésével T-2 táptalajra szélesztettem. 5 napos 25 C^o-on

történt inkubáció után a telepeket T-2 táptalajra replikáztam és a Petri-csészéket 35 C^o-os termosztátba helyeztem. Két nap múlva a csészéket összehasonlítottam és a mutáns telepeket - amelyek 35 C^o-on nem növekedtek - izoláltam.

5. Lehetőségek a csigaenzimes mutánedúsítási módszer hatékonyságának fokozására:

A/ dúsítás ismételt enzimkezeléssel:

A 3. fejezetben leírt módszerrel nem érhető el az összes vad sejt elpusztítása. Az enzimes kezelést túlélő sejteket egy újabb enzimkezeléssel próbáltam meg elpusztítani. Összekevertem a Schizosaccharomyces pombe L 972 h^m és a Schizosaccharomyces pombe L 972 ade6h^m törzsek sejtjeit körülbelül 100:1 arányban. A keverék-szuszpenziót a már ismert módon T-3 táptalajra ezélesztettem és 4 nap elteltével a megjelent telepeket lemos-tam. A sejteket T-4 tápoldatba vittem /10⁶ sejt/ml/. A sejteket is tartalmazó tápoldatból 50-50 ml-t 500 ml-es talpas gömblombikokba töltöttem és 6 órán keresztül rázógépen 30 C^o-on inkubáltam. Ezután minden lombikból kiemeltem 10-10 ml-t és 2 % enzimmal kezeltem 30 C^o-on. Újabb 6 óra múlva a túlélő sejteket centrifugálással összegyűjtöttem és steril desztillált vízzel háromszor átmostam. A harmadik mosás után a sejteket 2 ml nitrogén-mentes, T-4 tápoldatban felvettem, és 3 napig ezobahőmérsékleten inkubáltam a tenyészetet időnként fel-szuszpendálva. A szuszpenzió a sejteken kívül sok fal-törmelékkel is tartalmazott, de a mosás révén az oldha-tó és felvehető tápanyagok nagy részét eltávolítottam. Nitrogén hiányában a sejtek növekedése megállt, és a szuszpenzió hamarosan a stacioner fázisú tenyészetek állapotába került. A 4. napon a sejteket T-4 tápoldat-ba vittem és a sejtkoncentrációt 10⁵ sejt/ml-re állítva 6 órás inkubálás után megismételtem az enzimkezelést.

Mintavétel a kísérlet kezdetekor, az első enzimkezelés után, a második enzimkezelést megelőző 6 órás inkubálás előtt és a második enzimkezelés után történt. A mintákat megfelelő hígítással T-3 táptalajra szélesztettem, és 72 órás inkubálás után összehasonlítottam.

B/ dúsitás 2-desoxyglukózos előkezeléssel:

a/ Első lépésben meghatároztam azt a DG:glukóz arányt, amely a leghatásosabb a falszintézis gátlása szempontjából. A kísérlethez *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h⁻ törzse 14-16 órás T-1 tápoldatban rázatott tenyészetét használtam. A sejteket centrifugálásal öszegyűjtöttem, kétszer mostam steril desztillált vízzel, majd T-4 tápoldatba vittem, ahol a glukóz koncentrációja 1 % volt. A sejtkoncentrációt 10^6 sejt/ml-re állítottam. A szuszpenzióból ezután 1-1 ml-t 8 kémcsőbe töltöttem, és az egyes kémcsővekben az alábbi DG-mennyiségeket mértem: 1000; 750; 500; 250; 100; 25; 0 $\mu\text{g/ml}$. Ezt szobahőmérsékleten történő inkubáció követte időnkénti felezésű szuszpenzációval. A kémcsővekből időnként mintát vettem, és mikroszkóposan figyeltem a sejtek szétesését. Az intakt és széteső sejtek arányát Bürker-kamrában határoztam meg. 12 óra elteltével Bürker-kamrás számolással összehasonlítottam a szaporodás mértékét is. Egy következő kísérletben felező hígítási sorozatot készítettem T-4 tápoldatban glukózzal nézve 20 %-tól 0,15 %-ig. Az egyes hígítási lépésekből és a glukózmentes kontrollból 1-1 ml-t töltöttem kémcsővekbe, majd minden kémcsőbe 500 $\mu\text{g/ml}$ DG-t mértem. Ezután bevittem a sejteket is 10^6 sejt/ml koncentrációban. Az értékelés az előző kísérlethez hasonlóan történt.

- b/ Második lépésben megvizsgáltam a DG és a csigaenzim kölcsönhatását. A 14-16 órás tenyészet sejtjeit a fentiek szerint mostam, és 2 % glukózt tartalmazó T-4 tápoldatba vittem. A sejt koncentráció ismét 10^6 sejt/ml volt. A szuszpenzióból 1-1 ml-t 6 kémcsőbe töltöttem, majd 4 kémcsőbe 500 μ g DG-t és az 5. csőbe 20 mg csigaenzimet mértem. A 6. kémcső kontrollnak maradt. A DG-t tartalmazó kémcsöveknél egy kémcsőbe azonnal a további kémcsővekbe 1 illetve 2 óra elteltével szintén 20 mg enzimet adtam. 1 kémcsőbe nem került enzim. Az értékelés az előzőekhez hasonlóan történt.
- c/ Harmadik lépésben a DG-előkezeléssel kombinált csigaenzimes sejtfaibontást kipróbáltam mutánsdúsításra. A *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h^- és a *Schizosaccharomyces pombe* L 972 $ade6h^-$ törzsek sejtjeit 100:1 arányban az ismert módon T-3 táptalajra szélesztettem, majd 4 nap elteltével a telepeket lemostam, a sejteket T-4 tápoldatba vittem és 6 órán keresztül $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on rázatva inkubáltam. 5 óra elteltével a szuszpenzióhoz annyi glukózt mértem, hogy a végső koncentráció 2 % legyen. Egyúttal 0,05 %-nak megfelelő DG-t is adtam a szuszpenzióhoz. Ujabb egyórás inkubáció után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttem, mosás után T-4 tápoldatba vittem úgy, hogy a végső sejt koncentráció 10^5 sejt/ml legyen. Egy millilitert kémcsőbe mértem, hozzáadtam a 2 %-nak megfelelő csigaenzimet, és időnként felfuszpendálva szobahőmérsékleten tartottam 5 órán keresztül. A csészék lemosása után majd az enzimekezelés megkezdését követő 5 óra múlva mintát vettem, és megfelelő hígítás után T-3 táptalajra szélesztettem.

6. Csigaenzimes mutánsdúsítás *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Candida albicans* gombáknál;

A/ A mutánsdúsítás modellezése *Geotrichum candidum*mal;

A *Geotrichum candidum* 0055 és a *Geotrichum candidum* 0136 adeninigényes piros telepeket képző mutáns törzs több napos ferde tenyészetéből 100:1 arányú kevert szuszpenziót készítettem desztillált vízben. A sejteket T-3 táptalaj felületére szélesztettem olyan hígításban, hogy az inkubálás során különálló telepek jöjjenek létre, és a Petri-csészéket öt napra 30 C°-os termosztátba helyeztem. Az inkubáció ideje alatt kifejlődtek a telepek, és a sejtek nagy része artrospórákat képezett. 5 nap múlva a telepeket desztillált vízzel lemostam és a zömmel artrospóra állapotban levő sejteket T-4 tápoldatba vittem. A sejtkoncentráció 10^5 sejt/ml volt. A sejteket is tartalmazó tápoldatot 5-5 ml-enként 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokba töltöttem, és időnként felfuszpendálva 30 C°-on inkubáltam. Az inkubáció során a vad fonaldarabok és artrospórák kihajtottak és új, az enzimezésre érzékeny fonalat képeztek. A spórák hajtatásához szükséges idő meghatározását végeztem el először, különböző inkubációs idő után a sejteket egységesen 4 órán keresztül kezeltem 2 % csigaenzimmal 0,1 % merkaptotanol jelenlétében. A hajtatási idő 3, 4, 5, 6, 7, 8 és 9 óra volt. A hajtatás megkezdésekor és az enzimezés után mintát vettem és megfelelően hígítva T-3 táptalaj felületére szélesztettem. 72 órás 30 C°-on történő inkubálás után a piros és fehér telepeket összeszámoltam.

A továbbiakban 6 és 7 órás hajtatási idővel többször megismételtem a kísérletet.

B/ auxotrof mutáns izolálása *Geotrichum candidum*nál:

A *Geotrichum candidum* 0055 pár napos ferde tenyésztéről artrospóra-szuszenziót készítettem, majd T-2 táptalaj felületére szélesztettem úgy, hogy egy-egy Petri-csészére mintegy 5000 sejt kerüljön. Ezután a 3. fejezetben leírtak szerint a sejteket mutagén kezelésnek vettem alá, majd 5 napon keresztül 30 C^o-on inkubáltam. A telepeket desztillált vízzel lemostam és a sejteket T-4 tápoldatba vittem. 7 órás hajtatási idővel elvégeztem a 6/A fejezetben ismertett enzimkezelést. Mintavétel a hajtatás előtt és az enzimkezelés után történt. A mintákat megfelelően higitva T-2 táptalajra szélesztettem és 4 napig inkubáltam, majd a 3. fejezetben ismertettek szerint izoláltam a mutáns telepeket és meghatároztam a tápanyagigényüket. Az azonos tápanyagigényt mutató telepeket azonos mutáns telepeknek tekintettem.

C/ mutánédúsítás modellezése *Saccharomyces cerevisiae*vel:

Saccharomyces cerevisiae S 288c vad és *Saccharomyces cerevisiae* X 1687-16 C mutáns törzsek 14-16 órás T-1 tápoldatban rázatva nevelt tenyészetek sejtjeit 100:1 arányban T-2 táptalajra szélesztettem úgy, hogy majd különálló telepek jöjjenek létre. 4 napos inkubáció után a telepeket desztillált vízzel lemostam, és a sejteket T-4 tápoldatba vittem. A sejt koncentráció 10⁵ sejt/ml volt. A szuszenzióból 50-50 ml-t 500 ml-es talpae gömblombikokba mértem. 6 órás 30 C^o-on és rázógépen történt inkubáció után a lombikokból kiemeltem 1 ml-t és kémcsövekbe töltöttem. Minden kémcsövhöz 2 %-nak megfelelő csigaenzimet és 0,1 %-nak megfelelő merkaptotant adtam. A kémcsöveket időnként megrázva szobahőmérsékleten végeztem az enzimkezelést. A 6 órás inkubáció előtt és az enzimkezelés után mintát vettem. A mintákat megfelelően higitva T-3 táptalajra

szélesztettem. 48 órás inkubáció után összeszámoltam a piros és fehér telepeket.

D/ a mutánédúsítás modellezése *Candida albicans*sal:

A *Candida albicans* CBS 562 és *Candida albicans* liz⁻ 0144 törzsekkel elvégeztem a 6/C fejezetben ismertetett modellkísérleteket, azzal az eltéréssel, hogy a mintákat T-2 táptalajra szélesztettem, és 48 órás inkubáció után a telepeket T-5 táptalajra replikáztam. Ujabb 48 óra múlva a csészéket összehasonlítva összeszámoltam a vad és mutáns telepeket.

7. Dúsítás mikrobiális eredetű enzimmal:

A/ dúsítás *Trichoderma*-enzimmal:

a/ *Trichoderma*-fermentlé hatása a *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h⁻ törze különböző korú tenyészetének sejtjeire:

14-16 órás T-1 tápoldatban rázatva inkubált és 5 napos ferde *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h⁻ tenyészetek sejtjeiből külön-külön $5 \cdot 10^6$ sejt/ml koncentrációju szuszpenziót készítettem a *Trichoderma*-fermentlében. A szuszpenzióhoz annyi $MgSO_4$ -ot mértem, hogy a végső koncentráció 0,8 M legyen. Induláskor és később egyenlő időközönként mintát vettem. A mintákat részben 0,8 M-os $MgSO_4$ oldattal, részben desztillált vízzel 10-szeresére hígítottam, és hígítás után Bürker-kamrával meghatároztam a sejtszámot. A kétféle módon hígított mintákból kapott sejtszám különbsége a hypotóniás közegben széteső sejtek számát adta. A kísérletet elvégeztem DG-zal előkezelt sejtekkel is. Az előkezelés T-4 tápoldatban történt 2 % glukóz és 0,05 % DG jelenlétében, 30 C^o-on 1 órán keresztül inkubálva 10^6 sejt/ml koncentrációnál. Előkezelés után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttem, és a *Trichoderma*-fermentlébe vittem. Az enzimkezelést a már

ismertetett módon hajtottam végre.

b/ Modellkísérlet Trichoderma-fermentlével;

A kísérlet megegyezett az 5/B fejezetben ismertett modellkísérlettel, azzal a különbséggel, hogy az előkezelés után a sejteket nem T-4 tápoldatba, hanem Trichoderma-fermentlébe vittem. A fermentléhez 0,8 M-nak megfelelő $MgSO_4$ -ot adtam. Mintavétel a csészék lemosása után, és a 6 órás enzimkezelést követően történt.

B/ Streptomyces-enzim hatása a Saccharomyces cerevisiae RXII élesztő különböző korú tenyészetekének sejtjeire:

14-16 órás T-1 tápoldatban rázatva inkubált, és 5 napos ferde Saccharomyces cerevisiae RXII tenyészetek sejtjeiből külön-külön 10^7 sejt/ml koncentrációjú ezuszenziót készítettem a Streptomyces-fermentlében. A szuszpenzióhoz annyi KCl-ot mértem, hogy a végső koncentráció 0,6 M legyen. Induláskor és 6 óra elteltével mintát vettem. A mintákat részben 0,6 M-os KCl oldattal, részben desztillált vízzel tízszeresen hígítottam, és hígítás után Bürker-kamrával meghatároztam a sejtszámot. A kétféle módon hígított mintákból kapott sejtszám különbsége a hypotóniás közegben széteső sejtek számát adta.

A Z E R E D M É N Y E K I S M E R T E T É S E

1. Csigaenzim hatása a *Schizosaccharomyces pombe* L 972 h^m különböző koru tenyészeteknek sejtjeire:

Hat független kísérletből származó adatok átlaga szerepel az 1. ábrán az értékekhez tartozó szórással együtt. A görbék jól szemléltetik a különböző koru sejtek érzékenységét a csigaenzimes kezeléssel szemben. A 3 órás kezelési idő alatt a 14-16 órás tenyészetek sejtjeinek 98,5 % -a elpusztult, ugyanakkor a 4 napos tenyészetek sejtjeinél csak 15,5 %-os pusztulást tapasztaltam. Az eredmények alapján lehetségesnek látszik a fiatal sejtek szelektív pusztítása.

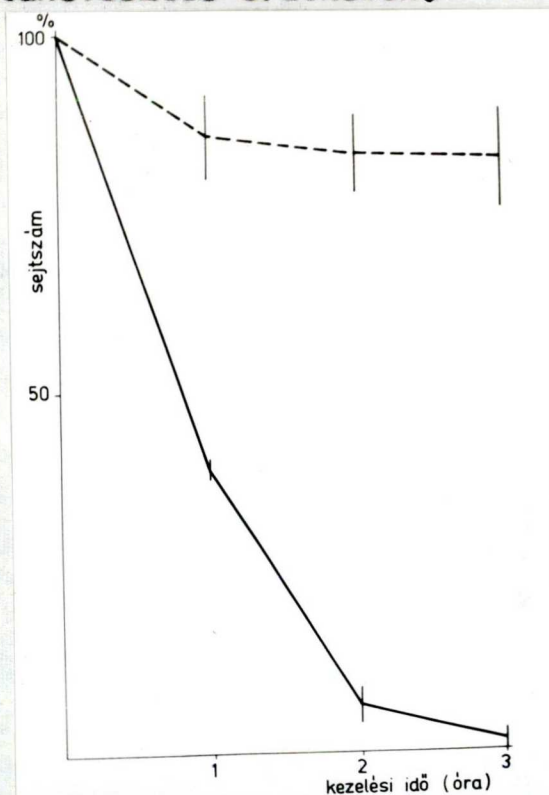
2. A mutánsdúsítás optimális körülményeinek meghatározása modellek segítségével:

A/ modellek felállítása és kipróbálása:

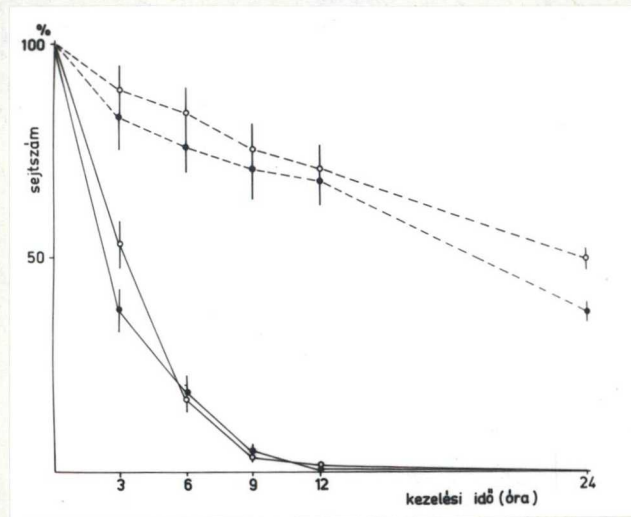
Öt 1:1 vad és mutáns illetve három 100:1 vad és mutáns arányú kísérlet adatait tüntettem fel a 2. ábrán. Az átlagosan 5 napos tenyészetek sejtjei eltérően reagálnak a csigaenzimes kezelésre. A T-4 tápoldatban a mutáns sejtek nem tudnak növekedni, ezért a csigaenzimmel szemben rezisztensek maradnak. A vad sejtek ezzel szemben azonnal növekedésbe kezdenek és sejtfaluk érzékennyé válik az enzimre. A falbontás az enzim jelenléte miatt rövidesen megindul, és a vad sejtek fokozatosan szétesnek. Mintegy 12 óra elteltével a vad sejtek tulnyomó többsége elpusztul miközben a mutánsok száma csak körülbelül 30 %-kal csökken. A mutáns-pusztulás a későbbiekben fokozódik.

Ez elsősorban három okra vezethető vissza. A mutáns sejtek fala sem teljesen ellenálló az enzimmel szemben, az enzimekésztmény jelentős mennyiségű szennyeződést tartalmazhat és ami a legfontosabb: a széteső vad sejtekből nagy mennyiségben szabadulhat fel adenin. Az utóbbival magyarázható az a jelenség is, hogy a 100:1 arányú modellnél valamivel nagyobb a mutánsvesztés, ugyanis a 100:1 modellben sokkal több vad sejt esik szét.

Mindkét modell egyértelműen bizonyítja, hogy lehetséges a vad sejtek szelektív elpusztítása, vagyis létrehozható egy mutánsdúsítási módszer. A módszer hatékonysága szempontjából azonban fontosnak látszik az enzimkezelés időtartamának csökkentése a minél alacsonyabb mutánsvesztés érdekében.



1. ábra: Csigaenzim hatása különböző korú tenyészetek sejtszámára. A görbék a kezelést túlélő sejtek számát ábrázolják a kezelési idő függvényében és az induló sejtszám százalékában. ----- 4 napos tenyészet; ——— 14-16 órás tenyészet sejtjei.



2. ábra: Modellek a mutánsdúsításra. A görbék a csigaenzimes kezelést túlélő sejtek számát ábrázolják a kezelési idő függvényében és az induló sejtszám százalékában. —○— 1:1 modell, vad sejtek; --○-- 1:1 modell, mutáns sejtek; —●— 100:1 modell, vad sejtek; --●-- 100:1 modell, mutáns sejtek.



3. ábra: Mutánsdúsítás modellezése. Az enzimekezelés hatására a vad /fehér/ telepképzők száma lecsökkent.

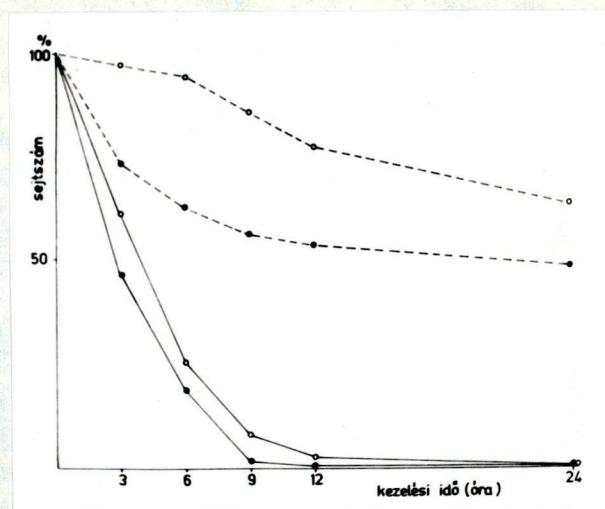
B/ az enzimkezelés időpontjának kiválasztása:

A vad és mutáns sejtek keverékét T-3 táptalajra szélesztettem és különböző ideig inkubáltam. Az inkubációs idővel arányosan növekedett a vad sejtek szelektív elpusztíthatósága. Két napos inkubáció után a mutáns és vad sejtek száma körülbelül azonos mértékben csökkent az enzimkezelés során. Három napos inkubáció után a mutáns sejtek ellenálló képessége hirtelen megnőtt és tovább fokozódott a 4 és 5 napig inkubált tenyészeteknél. A 4. ábrán a 3 és 4 napig inkubált modellek adatait tüntettem fel. A görbék a kezelést túlélő sejtek számát ábrázolják a csigaenzimes kezelési idő függvényében. Az 5 napig inkubált modellek adatai körülbelül azonosak a 4 napossal. A görbék két-két kísérlet adataiból számított átlagot ábrázolnak. A 3 és 4 napos inkubáció után a fiatal sejtek száma közel azonos mértékben csökken és 12 órás kezelési idő elteltével megközelíti a nullát. A mutáns sejtek száma a 3 napos kísérletnél körülbelül a felére csökken 12 óra alatt, szemben a 4 napos kísérletekkel, ahol a mutánsvesztés legfeljebb 25 %. Az eredményekből levonható az a következtetés, hogy az enzimkezelést minimálisan 4 napos inkubációnak kell megelőznie. Az adatok természetesen csak a táptalaj felületén történő inkubációra vonatkoznak.

C/ az enzimkezelés időtartamának és körülményeinek a meghatározása:

Az eddigi kísérletekben miután a sejteket T-4 táptalajba vittem azonnal elkezdtem az enzimkezelést, vagyis a mutáns sejtek 12 illetve 24 órán keresztül olyan közegben inkubálódtak, ahol bizonyos mennyiségű adenin-felvételre volt lehetőségük. Ennek az okaira

a 2/A részben már kitértem. Ha csökkentem az enzimkezelés időtartamát, részben megelőzhetem a mutáns sejtek növekedésének megindulását is. Vagyis az eddigieknél rövidebb kezeléssel csökkenteni tudom a mutánsvesztést. Az 5. ábrán kétféle kísérlet adatait tüntettem fel. Három olyan kísérlet átlagát, amikor az enzimes kezelés azonnal megkezdődött és öt olyan kísérlet átlagát, amikor az enzimkezelést a sejtek 6 órás inkubációja előzte meg T-4 tápoldatban. A vad sejtek száma mindkét típusú kísérletben megközelíti a nullát az indulástól számított 12. órában. A kezelést túlélő mutáns sejtek számában jelentős különbség figyelhető meg. A rövidebb ideig kezelt rendszerben a mutánsok száma 22 %-kal csökkent szemben a 12 óráig kezelttel, ahol a veszteség 31 % volt. Tehát az a megoldás a hatékonyabb, amikor 6 órás inkubáció után kezdődik az enzimkezelés.



4. ábra: Csigaenzim hatása T-3 táptalajon különböző ideig inkubált modellek sejtjeire. A görbék a kezelést túlélő sejtek számát ábrázolják a kezelési idő függvényében és az induló sejtszám százalékában. —●—3 napos modell vad sejtek; ---●---3 napos modell mutáns sejtek; —○—4 napos modell vad sejtek; ---○---4 napos modell mutáns sejtek. A sejtszámmeghatározás T-3 táptalajon szélesztéssel történt.

D/ A kidolgozott módszer hatékonyságának megállapítása:
16, egymástól független dúsitási modellkísérlet eredményeit az 1. táblázatban foglalalom össze.

	A mutáns sejtek az összes sejt %-ában		dúsulás mértéke	elméleti dúsíthatóság mértéke
	induláskor	enzimkezelés után		
1.	3,80	59,52	15,66	26,31
2.	1,44	92,30	64,10	69,44
3.	2,94	80,88	27,51	34,01
4.	0,75	51,81	69,08	133,33
5.	2,13	38,18	17,92	46,95
6.	1,11	61,11	55,05	90,09
7.	0,87	69,05	79,37	114,94
8.	1,63	50,00	30,67	61,35
9.	1,44	40,00	27,78	69,44
10.	1,27	45,95	36,18	78,74
11.	1,74	44,19	25,39	57,47
12.	3,11	75,90	24,41	32,15
13.	2,50	70,59	28,24	40,00
14.	1,68	56,52	33,64	59,52
15.	1,71	43,18	25,25	58,48
16.	0,93	60,67	65,24	107,52
átlag	1,82	58,74	39,09	67,48
szórás	0,21	3,92	5,68	7,75

1. táblázat: Mutánsdúsítás modellezése Schizosaccharomyces pombe-val.

Dúsulás mértéke: a második és az első oszlopban szereplő értékek hányadosa.

100

Az elméleti dúsulás mértéke: $\frac{\text{dúsulás mértéke}}{\text{induláskor}}$ az első oszlopban szereplő érték

A 16 kísérletben átlagosan 39,09-szeres dúsulást értem el. Ez az érték az elméleti dúsulás 58,74 %-a. Az átlageredmény azonban nem tükrözi pontosan a módszer hatékonyságát. Kiemelve azokat a kísérleteket, ahol a mutáns mennyisége induláskor 1 % alatt volt, az átlagosnál sokkal magasabb dúsulási értékeket figyelhetünk meg. Másrészt a legalacsonyabb hatékonyságot /15,66-szoros dúsulás/ az a kísérlet mutatta, ahol a legmagasabb volt az indulásnál a mutáns aránya /3,80 %/. Ebben az esetben az elméleti dúsulás értéke is jelentősen kisebb /26,31-szeres/ mint a 16 kísérlet átlagos dúsulása. Vagyis a dúsulás mértéke függ a kezdeti aránytól, és összehasonlítani illetve átlagolni csak az azonos mutáns: vad arányról induló kísérleteket érdemes. Mivel ez a feltétel csak elméletileg teljesíthető, betartásától eltekintettem.

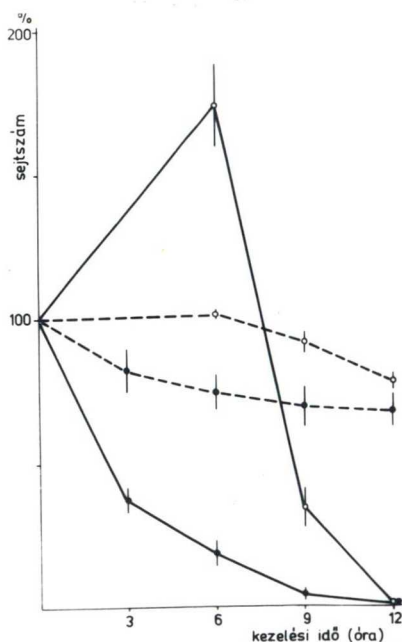
3. Auxotróf mutánsok dúsítása *Schizosaccharomyces pombe* ólesztőből csigaenzimes kezeléssel:

A modellekkel kidolgozott dúsítási módszerrel 18 auxotróf mutánst izoláltam. Az adatokat a 2. táblázat tartalmazza.

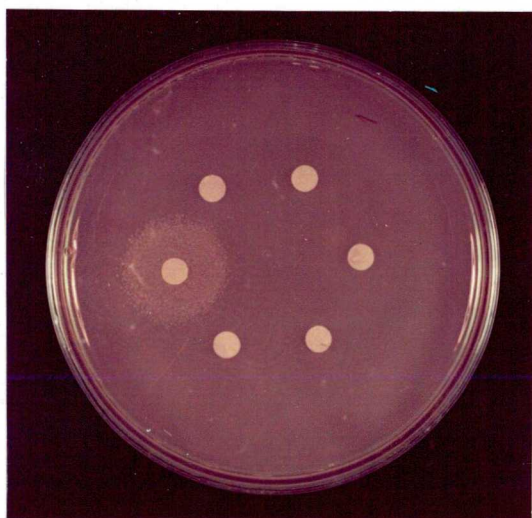
A 18 kísérletben az átlagos dúsulás 79,63-szoros volt, ami az elméleti dúsíthatóság 33,72 %-a. A szélső értékek: 5,95-szörös és 235,29-szeres dúsulás. Az új módszer segítségével izolált mutánsok között 4 adenin-igényes, 5 arginin-igényes, 2-2 hisztidin-, lizin- és metionin-igényes, 1-1 szerin-, tirozin-igényes és 1 olyan mutáns volt, amelyik lizint és arginint is igényelt. A sokféle mutáns arra enged következtetni, hogy a módszer általánosan használható.

mu- táns ti- pus	a mutáns sejtek az ösz- szes sejt %-ában		dúsulás mértéke	elméleti dúsitha- tóság mértéke
	induláskor	enzimkeze- lés után		
ade ⁻	0,65	9,09	13,98	153,84
ade ⁻	1,53	33,33	21,78	65,35
hisz ⁻	0,95	50,00	52,63	105,26
szer ⁻	0,24	50,00	208,33	416,67
arg ⁻	0,17	40,00	235,29	588,24
liz ⁻	0,46	40,00	86,95	217,39
arg ⁻	0,31	22,22	71,67	322,58
arg ⁻	1,29	7,68	5,95	77,52
met ⁻	0,76	10,00	13,15	131,58
arg ⁻	0,25	22,22	88,88	400,00
liz ⁻	0,51	39,13	76,72	196,08
liz ⁻ } arg ⁻ }	0,64	20,00	31,25	156,25
tir ⁻	0,42	77,77	185,14	238,10
ade ⁻	0,82	60,00	73,17	121,95
met ⁻	0,83	83,33	100,39	120,48
hisz ⁻	0,31	14,81	47,77	322,58
arg ⁻	0,31	14,81	47,77	322,58
ade ⁻	0,34	25,00	73,53	294,12
átl.	0,59	34,41	79,63	236,14
szórás	0,07	4,29	14,51	32,98

2. táblázat: Auxotróf mutánsok dúsítása Schizosaccharomyces pombe élesztőből.



5. ábra: A különböző időpontokban kezdett enzimkezelés hatása. A görbék a mindenkori sejtszámot ábrázolják a kezelési idő függvényében és az induló sejtszám százalékában. —●— vad sejtek, --●-- mutáns sejtek száma amikor az enzimkezelés azonnal megkezdődik. —○— vad sejtek, --○-- mutáns sejtek száma, amikor az enzimkezelés 6 órával később kezdődik.



6. ábra: Az izolált klónok tápanyagigényének meghatározása korong-módszerrel. Részletes magyarázatot lásd a Módszer fejezetben.

4. Magas hőmérsékletre érzékeny mutánsok dúsitása Schizosaccharomyces pombe élesztőből csigaenzimes kezeléssel.

Az új mutánsdúsitási módszer segítségével három magas hőmérsékletre érzékeny mutánst sikerült izolálnom. A kísérletek adatait a 3. táblázat tartalmazza. Az átlagos dúsulás 80,5-szörös, ami az elméleti dúsíthatóság 73,4 %-a. A dústítás hatékonysága valamivel jobb mint az auxotróf mutánsoknál.

a mutáns sejtek az összes sejt %-ában		dúsulás mértéke	elméleti dúsíthatóság mértéke	
induláskor	enzimkezelés után			
1.	1,02	48,04	47,10	98,04
2.	0,81	83,67	103,30	123,46
3.	0,93	84,81	91,20	107,52
átl.	0,92	72,17	80,50	109,67
szórás	0,03	12,07	17,07	7,42

3. táblázat: Magas hőmérsékletre érzékeny mutánsok dúsitása Schizosaccharomyces pombe élesztőből.

5. Lehetőségek a csigaenzimes mutánsdúsitási módszer hatékonyságának fokozására:

A/ Dústítás ismételt enzimkezeléssel:

Két kísérlet adatait tartalmazza a 4. táblázat.

a mutáns sejtek az összes sejt %-ában

	1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet
indulásnál	0,75	2,13	1,44
az első enzimkezelés után	51,81	38,18	44,99
a második enzimkezelés előtt	28,13	27,52	27,83
a második enzimkezelés után	93,75	96,64	95,20

4. táblázat: Dúsitás ismételt enzimkezeléssel.

A dúsulás mértéke az első enzimkezelés alatt:

1. kísérlet: 69,08
2. kísérlet: 17,92
átlag: 43,05

A dúsulás mértéke a második enzimkezelés alatt:

1. kísérlet: 3,33
2. kísérlet: 3,51
átlag: 3,42

A dúsulás mértéke a kétlépcsős dúsitás során együttesen:

1. kísérlet: 125,00
2. kísérlet: 45,37
átlag: 85,19

Az elméletileg elérhető dúsulás:

1. kísérlet: 133,33
2. kísérlet: 46,94
átlag: 90,14

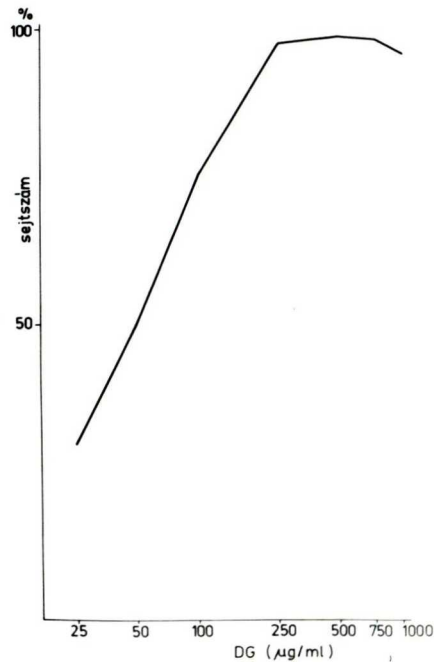
Az első enzimkezelés utáni arány a három napos inkubáció során megváltozott. Ez azzal magyarázható, hogy az enzimkezelés után nem sikerült minden szennyeződést kimocni a rendszerből, és a sejtek egy része még szaporodhatott.

Az átlagértékek ebben az esetben sem jellemzik reálisan a módszer hatékonyságát. A dúsulás mértéke a két kísérletben rendkívül eltérő, ami elsősorban azzal magyarázható, hogy már az indulásnál is nagyon különbözött a mutánsok aránya. Sokkal jellemzőbb az az adat, amely arra ad választ, hogy mi a viszony az elméleti dúsíthatóság és a tényleges dúsulás között. Az 1. kísérletnél 93,75 %-ban, a 2. kísérletnél 96,64 %-ban közelítette meg az elméleti értéket a kísérleti érték.

B/ Dúsítás 2-deoxyglukózos előkezeléssel:

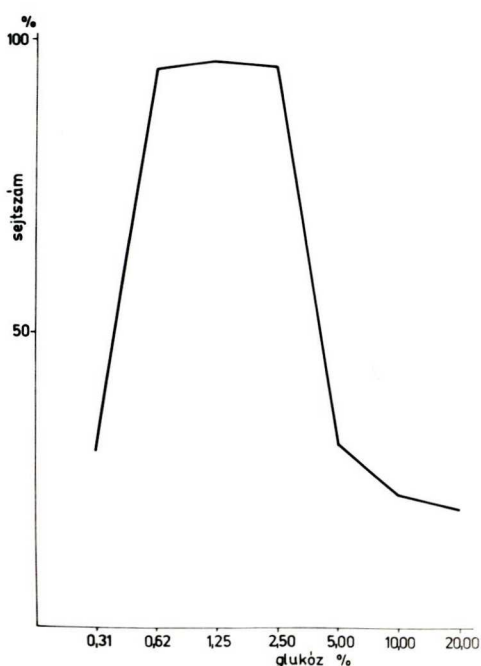
a/ A falszintézis gátlása szempontjából hatásos DG:glükóz arány meghatározása történt az első lépésben. Az egységesen 1 % glukózt tartalmazó, de különböző DG-mennyiségekkel kiegészített T-4 tápoldat-sorozatban inkubálva a sejteket az első két órában nem tapasztaltam sejtszétesést. A további inkubáció során azonban lassan megindult a sejtek lizise. 4 óra elteltével az 500 $\mu\text{g/ml}$ és a 250 $\mu\text{g/ml}$ DG-t tartalmazó variánsban volt jelentősebb szétesés. Az előbbinél 60 %, az utóbbinál 50 %-ban estek szét a sejtek. 20 órás inkubáció utáni adatokat ábrázol a 7. ábra.

Az eredmények alapján 250 $\mu\text{g/ml}$ és 750 $\mu\text{g/ml}$ közötti értékeknél várható a teljes szétesés vagyis a falszintézis legerősebb gátlása. 100 $\mu\text{g/ml}$ -nél alacsonyabb DG-tartalomnál a szétesés mértéke csökken, és egyúttal a sejtek szaporodni is képesek.



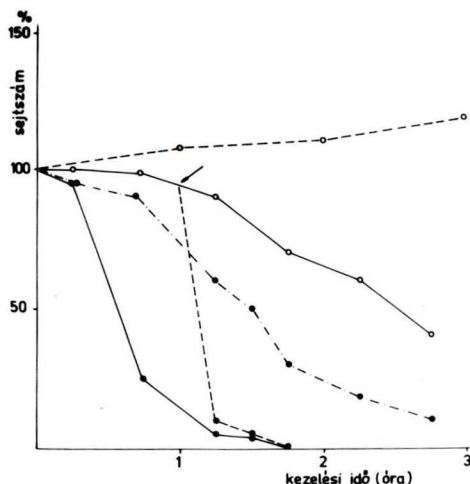
7. ábra: A sejtek szétesése különböző DG koncentráció hatására. A görbe a szétesett sejtek számának változását ábrázolja a DG koncentráció függvényében és az összes sejt százalékában.

1000 µg/ml koncentrációnál a DG feltehetőleg már a sejtek növekedését is gátolja, és így a sejtek egy része intakt marad. A fentiek alapján az 500 µg/ml-es koncentrációt választottam ki, és ezzel végeztem el a következő kísérletet. Az egységesen 500 µg/ml DG-t tartalmazó, de különböző glukóz-mennyiségekkel kiegészített T-4 tápoldat-sorozatban 20 óráig inkubálva a sejteket a 8. ábrán feltüntetett adatokat kaptam. A 0,62 és 2,5 %-os tartományban tapasztaltam a legnagyobb mérvű szétesést. Az ennél magasabb glukóztartalomnál már szaporodás is jelentkezett, az alacsonyabb értékeknél pedig a DG növekedést is gátló hatása magyarázhatja a csökkenő arányú szétesést. A két kísérlet tapasztalatai alapján a továbbiakban 2 % glukózt, és 0,05 % DG-t tartalmazó T-4 tápoldattal dolgoztam.



8. ábra: A DG hatásának függése a glukózkoncentrációtól. A görbe a széteső sejtek számának változását ábrázolja a glukózkoncentráció függvényében és az összes sejt százalékában.

b/ A DG és a csigaenzim kölcsönhatásának vizsgálata. A kísérleti adatokat a 9. ábrán tüntettem fel. /Az áttekinthetőség kedvéért azok az adatok nem szerepelnek az ábrán, amelyek a 2 órás DG előkezelés utáni enzimkezelést jellemzik. A 3. órában a sejtszám itt is nullára csökken./ A sejtek kombinált kezelése jelentősen megnöveli a csigaenzim hatásosságát. Egy és háromnegyed óra alatt gyakorlatilag az összes sejt szétesik, és tulajdonképpen mindegy, hogy az enzimes kezelés azonnal vagy némi késéssel kezdődik. A 2. fejezet értékelésénél elemzett okok miatt mégis az a megoldás tűnik jobbnak, ahol rövidebb az enzimkezelés.



9. ábra: A DG és csigaenzim kölcsönhatása. A görbék a kezelést túlélő sejtek számának változását követik a kezelési idő függvényében és az induló sejtszám százalékában. ---●--- csak csigaenzimmel kezelt sejtek; —○— csak DG-zal kezelt sejtek; —●— DG-zal és csigaenzimmel egyszerre kezelt sejtek; --●-- DG-os előkezelés után csigaenzimmel kezelt sejtek /a nyíl az enzim bemérését jelzi/; ---○---kontroll.

c/ A DG előkezeléssel kombinált mutánedúsítás modellezése:

Három kísérlet eredményeit tartalmazza az 5. táblázat. A modellkísérletekben a kombinált kezelés sokkal hatásosabb, mint a kizárólag enzimes kezelés. Mindhárom kísérletben nagyobb arányú dúsulást tapasztaltam, mint a csigaenzimes módszer átlaga. Az egyes kísérletek eredményeinek eltérése azzal magyarázható, hogy már kezdéskor is különbözött a mutáns és vad sejtek aránya. Éppen ezért az átlagértékek nem jellemzik reálisan a módszer hatékonyságát.

a mutáns sejtek az összes sejt %-ában		dúsulás mértéke	elméleti dúsíthatóság mértéke	
induláskor	enzimkezelés után			
1.	1,05	97,10	92,48	95,24
2.	1,29	90,29	69,99	77,52
3.	0,21	71,48	340,09	476,19
átlag	0,85	86,27	167,52	216,32
szórás	0,39	7,41	85,61	130,10

5. táblázat: DG előkezeléssel kombinált mutánsdúsítás modellezése.

6. Csigaenzimes mutánsdúsítás *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae* és *Candida albicans* gombákkal;

A/ A mutánsdúsítás modellezése *Geotrichum candidum*nál:
A különböző hajtatási idővel elvégzett modelleknél kapott eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze.

hajtási idő	enzimkezelési idő	átlagos dúsulás	kísérletek száma
3	4	7,81	2
4	4	8,89	2
5	4	18,39	2
6	4	68,77	8
7	4	62,27	6
8	4	42,31	2
9	4	13,50	2

6. táblázat: Mutánsdúsítás modellezése *Geotrichum candidum*nál.

Maximális dúsulást a 6 órás hajtatási idővel sikerült elérnem. Ezt megközelítette a 7 órás idő is, ezért a továbbiakban a modelleket ezzel a két hajtatási idővel végeztem. Nehezen magyarázható, hogy miért csökken a hatékonyság a 8 és 9 órai inkubálás után kezdett enzimekkelésnél. Lehetséges, hogy a mutáns artrospórák is növekedésnek indulnak, bár mikroszkópban ezt nem sikerült megfigyelnem. Magyarázható a jelenség talán azzal a ténnyel is, hogy a vad spórák kihajtása már olyan mérvű, hogy az osztódás miatt megnő a vad sejtek száma. 6 órás hajtatással elvégzett nyolc modellkísérlet adatait összegeztem a 7. táblázatban.

	a mutáns sejtek az összes sejt %-ában		dúsulás mértéke	elméleti dúsíthatóság mértéke
	induláskor	enzimkezelés után		
1.	0,39	41,01	105,12	256,40
2.	0,39	35,11	89,74	256,40
3.	4,16	76,02	18,27	24,00
4.	4,16	82,01	19,71	24,00
5.	6,06	97,69	16,12	16,50
6.	6,06	93,75	15,47	16,50
7.	0,26	36,19	139,19	384,60
8.	0,26	38,10	146,54	384,60
átlag	2,72	62,46	68,77	170,38
szórás	1,45	9,71	20,43	59,28

7. táblázat: Mutánsdúsítás modellezése *Geotrichum candidum*-nál 6 órás hajtatási idővel.

A két szélső érték 15,47- illetve 146,54-szeres súsulás. Az óriási szórást részben az indulási vad;mutáns arány szórása magyarázza. Ha figyelembe vesszük, hogy milyen mértékben közelíti meg a tényleges dúsulás az elméleti dúsíthatóságot, a szórás már kisebbnek bizonyul, de még itt is nagyok a különbségek. A két szélső érték 36,19 % és 97,69 %.

B/ Auxotróf mutáns izolálása Geotrichum candidumnál:

A csigaenzimes dúsítási módszer segítségével egy adenin-igényes mutánst sikerült izolálnom. A mutánsok arányát 2,5 %-ról 50 %-ra emeltem, vagyis 20-szoros dúsulást értem el. Az elméleti dúsíthatóság ebben a kísérletben 40-szeres volt.

C/ A mutánsdúsítás modellezése Saccharomyces cerevisiae-nél:

Öt modellkísérlet adatait tüntettem fel a 8. táblázatban.

	a mutáns sejtek az összes sejt %-ában		dúsulás mértéke	elméleti dúsíthatóság mértéke
	induláskor	enzimkezelés után		
1.	3,14	60,70	19,33	31,85
2.	0,97	13,60	14,47	106,38
3.	0,94	12,70	13,51	106,38
4.	4,39	66,66	15,18	22,78
5.	4,39	62,50	14,23	22,78
átlag	2,76	43,23	15,34	58,03
szórás	0,78	12,32	1,03	19,81

8. táblázat: Mutánsdúsítás modellezése Saccharomyces cerevisiae-nél.

A módszer hatékonysága ennél a fajnál a legalacsonyabb. Az átlagos dúsulás 15,34-szeres, de a maximális dúsulás is csak 19,33-szoros. A vad sejtek száma általában 90-95 %-kal csökkent, de ugyanakkor a mutáns sejtek között is nagyarányú pusztulást tapasztaltam. Lehetséges, hogy ez a modellhez kiválasztott mutáns törzse speciális tulajdonsága miatt következett be és más törzssel modellezve sokkal jobb eredményeket értem volna el.

D/ A mutánsdúsítás modellezése *Candida albicans*sal:
Öt modellkísérlet adatait tüntettem fel a 9. táblázatban.

	a mutáns sejtek az összes sejt %-ában		dúsulás mértéke	elméleti dúsíthatóság mértéke
	induláskor	enzimkezelés után		
1.	0,13	12,50	96,15	769,23
2.	0,27	18,75	69,44	370,37
3.	0,27	28,00	103,70	370,37
4.	1,46	27,77	19,02	68,49
5.	1,46	26,05	17,84	68,49
átlag	0,72	22,62	61,23	329,39
szórás	0,30	3,04	18,38	129,00

9. táblázat: Mutánsdúsítás modellezése *Candida albicans*sal.

Az átlagos dúsulás 61,23-szoros és a két szélső érték: 17,84-szeres és 103,70-szeres dúsulás.

7. Dúsítás mikrobiális eredetű enzimekkel:

A/ Dúsítás Trichoderma-enzimmal:

a/ Trichoderma-fermentlé hatása a Schizosaccharomyces pombe L 972 h⁻ törzs különböző korú tenyészetének sejtjeire:

A kísérleti eredményeket a 10. táblázatban tüntetem fel.

kezelési idő /óra/	széteső sejtek száma az összes sejt %-ában			
	DG-os előkezeléssel		DG-os előkezelés nélkül	
	14 órás te- nyészet sejtjei	5 napos tenyészet sejtjei	14 órás tenyészet sejtjei	5 napos tenyészet sejtjei
0,5	0	0	15	0
1,0	1	0	58	2
1,5	23	6	95	5
2,0	72	15	100	31
2,5	95	23	100	44
3,0	100	60	100	67

10. táblázat: Trichoderma-fermentlé hatása a Schizosaccharomyces pombe különböző korú tenyészetének sejtjeire.

A Trichoderma-enzimek körülbelül hasonló hatékonysággal ejtik szét a sejteket mint a csigaenzim. A DG-os előkezelés itt is fokozza az enzim hatását. A széteső sejtek száma nem azonos a protoplasztok számával. A desztillált víz hatására széteső sejteknek legfeljebb 50 %-a volt valódi protoplaszt 3 órás kezelés után is. A különböző korú sejtek eltérő érzékenysége alapján így is lehetségesnek látszik a fiatal sejtek szelektív elpusztítása. A DG-os előkezeléssel kombinált megoldás látszik jobbnak, mivel ott a rövidebb idejű enzimkezelés

kevesebb öreg sejtet pusztít el.

b/ Modellkísérlet Trichoderma-fermentlével:

Két modellkísérletből a következő adatokat kaptam:

A mutáns aránya a dúsítás előtt:

1. kísérlet: 0,77 %

2. kísérlet: 0,10 %

A mutáns aránya a dúsítás után:

1. kísérlet: 40,00 %

2. kísérlet: 42,11 %

A dúsulás mértéke:

1. kísérlet: 51,94-szeres

2. kísérlet: 421,10-szeres

Az elméleti dúsíthatóság értéke:

1. kísérlet: 129,87-szeres

2. kísérlet: 1000,00-szoros

A két kísérlet dúsulásának átlaga 236,52. Sajnos reális következtetés levonásához ez a két adat nem elegendő. Ennek ellenére megállapítható, hogy Trichoderma-enzimekkel is lehetséges a dúsítás.

B/ Streptomyces-enzim hatása a Saccharomyces cerevisiae RXII élesztő különböző korú tenyészetek sejtjeire:

Hat, egymástól független kísérlet adatait tartalmazza a 11. táblázat.

A Streptomyces-enzimek is szelektíven hatnak a különböző korú sejtekre. 6 órás kezelés alatt közel 100 %-osan szétejtik a fiatal sejteket, és csak 23 %-os pusztulást okoznak az öreg sejteknél.

Az eredmények alapján Streptomyces-enzimokkal is lehetségesnek látszik a mutánsdúsítás.

széteső sejtek száma az összes sejt %-ában		
	14-16 órás tenyészetek sejtjei	5 napos tenyészetek sejtjei
1.	100,00	6,35
2.	100,00	24,00
3.	96,74	32,76
4.	100,00	42,67
5.	100,00	28,41
6.	99,01	2,86
átlag	99,29	22,84
szórás	0,53	6,32

11. táblázat: Streptomyces-enzim hatása a Saccharomyces cerevisiae RXII élesztő különböző korú tenyészetek sejtjeire.

M E G B E S Z É L É S

Az auxotróf gombamutánsok csigaenzimmal történő feldúsításának lehetőségét először modellkísérletekben próbáltam ki. Megvizsgáltam a csigaenzim hatását a különböző korú Schizosaccharomyces pombe tenyészetek sejtjeire. Eredményeim azt mutatták, hogy az öt napos tenyészetek sejtjei ellenállóak a fal enzimes emésztésével szemben. Vagyis, a különböző korú sejtek keverékét kezelve csigaenzimmal az enzim szelektíven csak a fiatal sejtek falát képes oldani.

A következő kísérletekben olyan modellt állítottam össze, ahol a vad és mutáns sejtek közül szelektíven csak a vad sejteket pusztította el az enzimkezelés. A modellben a vad és mutáns sejteket a Schizosaccharomyces pombe L 972 h⁻ és a Schizosaccharomyces pombe L 972 ade6h⁻ törzs képviselte. Az utóbbi megfelelő körülmények között piros telepeket képez, azaz a szélesztéssel történő sejtszám meghatározásnál a két törzs telepei vizuálisan is elkülöníthetők. Hasonló megoldások az irodalomból már ismeretesek /Moat, Peters és Srb, 1959; Snow, 1966; Vianyovszky, 1972;/. Az 1:1 illetve 100:1 vad és mutáns arányú sejtkeverékek két kísérlet-sorozatban meghatároztam a vad sejtek szelektív elpusztításának feltételeit. A keveréket olyan táptalaj felületére /T-3/ szélesztettem, ahol mind a vad, mind a mutáns sejtek szaporodhattak. A szélesztéstől számított különböző időtartamok után a megjelenő telepek sejtjeit szelektív /T-2/ táptalajba vittem. A szelektivitást az jelentette, hogy csak a

vad sejtek növekedhettek. A sejteket enzimkezelttem, és a túlélők közt megállapítottam a mutáns: vad arányt. Azt tapasztaltam, hogy ilyen módszerrel a szélesztés utáni 4 napos inkubáció elegendő ahhoz, hogy mind a vad mind a mutáns sejtek elszaporodjanak és ugyanakkor megöregedve rezisztenssé váljanak az enzimkezeléssel szemben. A szelektív tápoldatban azután csak a vad sejtek növekedtek, azaz csak ezek vesztették el az ellenálló képességet az enzimmel szemben. Sajnos a vad sejtek megfelelő mértékű pusztításához hosszú kezelési idő /12 óra/ volt szükséges és a mutáns sejtek egy jelentős része is elpusztult. A kezelési idő csökkentését értem el a második kísérlet-sorozatban. Ha a négy napos telepek sejtjeit a szelektív T-4-es tápoldatba vittem, és csak 6 óra múlva kezdtem meg az enzimkezélést, akkor már 6 órás kezelési idő is megfelelőnek bizonyult. Közel valamennyi vad sejt elpusztult, és csak 22 %-kal csökkent a mutánsok száma.

Miután tisztáztam a vad sejtek szelektív elpusztításának a feltételeit, 100:1 vad:mutáns modellekkel meghatároztam a módszer hatékonyságát. 16 kísérletben átlagosan 39,1-szeres dúsulást értem el. Az egyes dúsulások a hozzájuk tartozó elméleti dúsíthatósági értékeket átlagosan 58,7 %-ban érték el.

A modellekkel kidolgozott új módszerrel a továbbiakban auxotróf és magas hőmérsékletre érzékeny mutánsokat dúsítottam. *Schizosaccharomyces pombe* L-972 h⁻ törzs sejtjeit a mutagén kezelés után a már ismert módon elszaporítottam, szelektíven fiatalítottam, és enzimmel kezeltem. 18 auxotróf mutánst izoláltam ezzel a módszerrel. Az átlagos dúsulás 79,6-szoros volt, tehát jóval magasabb, mint a

modellkísérleteknél. A különbség természetesen nem azzal magyarázható, hogy a vad sejtek falának érzékenysége változott meg az enzimmel szemben. Ha figyelembe vesszük a mutáns mennyiségét induláskor a modellkísérletekben és az új mutánsok izolálásánál, az eltérést meg tudjuk magyarázni. Az előző esetben átlagosan 1,8 %, az utóbbi esetben 0,6 % volt a mutáns sejt. Vagyis hasonló mennyiségű vad sejt elpusztítása a modellekénél sokkal kisebb mérvű dúsulásnak tűnik. Érdeemes összehasonlítani a táblázatban 8. helyen szereplő modellkísérlet és a szerin-igényes mutáns dúsitásának adatait. A modellben 1,63-ról 50 %-ra, a szerin-igényes mutánsnál 0,24-ről 50 %-ra nőtt a mutánssejtek aránya. A modellben 98 %, a szerin-igényes mutánsnál 99 %-ban kellett elpusztulniuk a vad sejteknek, hogy az említett eredmény szülessen. A két kísérletben tehát közel azonos hatékonysággal dolgozott az enzim, mégis az egyik esetben 30,67-szeres a másik esetben 208,33-szoros dúsulást okozott.

Magas hőmérsékletre érzékeny mutánsoknál nem végeztem el modellkísérletet, de az új módszer alkalmazásával három mutánst izoláltam. Az átlagos dúsulás 80,5-szörös volt, ami közel azonos az autotrófoknál kapott eredménnyel.

Megkíséréltem a csigaenzimes módszer hatékonyságának fokozását is. Ez elsősorban az enzimkezelés hatékonyságának növelésével érhető el. A modellkísérletekben a növekedésben levő sejtek egy kis hányada általában túlélte az enzimkezelést, és voltak olyan vad sejtek is, amelyek nagyon lassan, késsve kezdtek növekedni a szelektív T-4-es tápoldatban. Egy ismételt enzimkezeléssel az ilyen vad sejtek nagy részét is sikerült elpusztítanom. Hasonló megoldást, az eljárások

megismétlését mások is alkalmazták dúsítási módszereikben. Például a szűréses módszernél mindig többször szűrnek a rendszert /Woodward, De Zeeuw, Srb, 1954/, vagy egy másik példa: Lubin /1962/ ismételt penicillin-kezeléssel és ismételt tríciumos kezeléssel dúsított auxotróf mutánsokat. Az ismételt csigaenzimes kezeléssel sikerült elérnem, hogy a túlélő sejtek 95,2 %-a volt mutáns. Ez 85,2-szeres dúsulásnak felelt meg.

Az enzimes kezelés hatékonyságát más módon is sikerült fokoznom. A glukóz-analóg 2-desoxyglukóz /DG/ segítségével a fal szintézisét gátoltam illetve zavarokat idéztem elő a szintézis-folyamatokban. A DG első lépésben foszforilálódik, azaz DG-6P képződik, ami a továbbiakban a foszfoglukomutáz enzimhez kapcsolódik. Az enzim nem képes DG-1P-tá alakítani a DG-6P-öt, ami felhalmózódva az enzim működését gátolja. Mivel a glukánok szintéziséhez glukóz-1P-on át vezet az út és a foszfoglukomutáz a gátlás miatt nem tölti be normálisan a funkcióját, zavarok lépnek fel a falképzésben /Megnet, 1965/. Az elégtelen falképzés a sejtek széteséséhez vezet. Megjegyzendő, hogy a DG hatása nem korlátozódik kizárólag a glukánképzésre, bizonyos mértékben a mannánok szintézisét is zavarja /Krátky, Biely és Bauer, 1975/. Első lépésben két kísérletsorozattal meghatároztam azt a DG:glukóz arányt, amely hypotóniás közegben a sejtek szétesését okozza. Az 1:20 és 1:50 közé eső értékek bizonyultak a leghatásosabbnak, Biely, Krátky, Kovařík és Bauer, /1971/ hasonló eredményeket kaptak *Saccharomyces cerevisiae*-nél. 2 % glukózt és 0,05 % DG-t tartalmazó T-4 tápoldatban a fiatal *Schizosaccharomyces pombe* sejtek 4 órás inkubáció után kezdenek rohamosan szétesni. Ha azonban a tápoldatban csigaenzimet is mérünk az összes sejt elpusztul 105 perc alatt. Ha az enzimet a DG után egy órával adjuk a sejtekhez, a teljes pusztuláshoz ele-

gendő 45 perc is. Tehát a csigaenzim hatása DG-os előkezeléssel fokozható. A szinergista hatás már korábbi vizsgálatokból is ismert volt /Birnbom, 1971; Foury és Goffeau, 1973/. Foury és Goffeau /1973/ a DG-on kívül glicerolt illetve glukózt tartalmazó közegben előkezelve a *Schizosaccharomyces pombe* sejteket 20 illetve 30 percig, mintegy 95 illetve 70 %-os protoplasztképzést ért el 2 órás enzimkezeléssel. Az új eljárással elvégeztem három modellkísérletet. Rövidebb kezelési idővel /5 óra/ nagyobb mérvű, átlagosan 167,5-szörös dúsulást értem el mint előkezelés nélkül. Vagyis az enzimes módszer hatékonysága ezen az úton is fokozható.

Az eddigi eredmények kizárólag a *Schizosaccharomyces pombe* vonatkoznak. Felmerül a kérdés, hogy a hatékonynak bizonyult módszer alkalmazható-e más gombáknál is? Kiválasztottam három további olyan fajt, amely falszerkezetű és a protoplasztálás körülményeit tekintve eltér a *Schizosaccharomyces pombe*től. A három faj közös jellemvonása, hogy a csigaenzim hatékonyságát a 2-merkaptoetanol jelentősen megnöveli szemben a *Schizosaccharomyces pombe*val. A jelenség valószínű magyarázata a vegyület redukáló hatásával kapcsolatos. Feltehetőleg a sejtfal-proteinekben található diszulfid-kötések redukálódnak, és a fal szerkezete lazább lesz /Nurminen, Oora és Soumalainen, 1965/. Mindhárom fajnál vad és mutáns törzsek segítségével modelleket állítottam össze.

A fonalas növekedést mutató és artrospórákat képző *Geotrichum candidum*nál a módszer minimális változtatással kitűnően bevált. A változtatás mindössze annyi, hogy az enzimkezelést 0,1 % 2-merkaptoetanol jelenlétében és 4 órán keresztül célszerű végezni. Nyolc modellkísérletben 68,8-szörös dúsulást értem el. Egy auxotróf mutáns izolálásánál a mutáns arányát 2,5 %-ról 50 %-ra sikerült emelnem. Ez ugyan alacsony dúsulást jelent, de több kísérletből valószínűleg jobb

átlageredményt is el lehet érni.

A *Saccharomyces cerevisiae*-nél és a *Candida albicans*-nál is sikerrel próbáltam ki a modelleket. Az előbbinél 15,3 az utóbbinál 61,2-szeres átlagos dúsulást kaptam öt-öt kísérletből. Változó hatékonysággal, de mindhárom fajnál eredményre vezettek tehát a kísérletek. Feltehető, hogy a kétszeres enzimkezelés és a DG-os előkezelés itt is fokozhatja majd az eredményeket.

Számos gombafajnál és törzsnél a sejtfalat mai ismereteink szerint nem lehet csigaenzimmel bontani. Ennek az esetek túlnyomó többségében csak technikai akadályai vannak, és a módszerek finomításával megoldható lesz a fal emésztése. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy mikrobiális enzimekkel is lehet protoplasztokat képezni. Kérdés, hogy ezek az enzimek alkalmasak-e mutánsdúsításra? Kísérleteimben *Trichoderma*- és *Streptomyces*-enzimekkel próbálkoztam. *Schizosaccharomyces pombe* L 972 törzs hővel előlt sejtjeivel indukált *Trichoderma viride* olyan enzimeket bocsájtott a környezetébe, amelyek képesek az intakt élesztősejtek falát bontani. Az indukált tenyészetek fermentlevét 14-16 órás *Schizosaccharomyces pombe* L 972 tenyészet sejtjeihez adva három órás inkubáció után teljes szétesés következett be. Öt napos tenyészetnél 3 óra alatt a szétesés 60 %-os volt, azaz *Trichoderma*-fermentlével is lehetséges a fiatal sejtek szelektív elpusztítása. De Vries *Schizophyllum commune*-nél szintén eltérő érzékenységet tapasztaltam *Trichoderma*-fermentlével szemben fiatal és 4-5 napos sejteknél /1972/. Az egy órás DG-os előkezelés itt is serkentőleg hatott. Az előkezelt fiatal sejteket a fermentlé már két óra alatt szétejtette. Két modellkísérletben 51,9-szeres és 421,1-szeres dúsulást sikerült elérnem.

Az utóbbi a legmagasabb a dolgozatban szereplő összes kísérlet között. Reális átlagérték meghatározásához több kísérletet kell még elvégezni, de már ez a két adat is arra utal, hogy nem csak csigaenzimmal, hanem mikrobiális eredetű enzimekkel is lehet mutánsokat dúsitani.

Saccharomyces cerevisiaevel indukált Streptomyces tenyészet fermentlévének aktivitását is megvizsgáltam. Itt is különböző mértékű falbontást tapasztaltam a 14 órás és az 5 napos tenyészetek sejtjeinél. A fiatal sejteket átlagosan 99,3 %-ban, az öreg sejteket 22,8 %-ban pusztította el a fermentlé 6 órás kezelése alatt. Modellkísérleteket Streptomyces-fermentlével ugyan nem végeztem, de a szelektív hatás alapján joggal feltételezhető, hogy ez az enzimpreparátum is alkalmas lesz mutánsdúsitásra.

Az ismertetett eredmények alapján elmondható, hogy sikerült kidolgozni egy új, hatékonyan alkalmazható mutánsdúsitási módszert. Az enzimes módszer jellemzőit más dúsitási eljárásokkal összehasonlítva a következőkben foglalom össze:

- 1/ A gombáknál általánosan használható módszerré válhat. Kísérleteimben csak 4 fajnál próbáltam ki, de mivel az enzimes falbontás valamennyi gombára történő kiterjesztésének nincs elvi akadálya, feltehetőleg megoldható lesz a vad sejtek szelektív elpusztítása is. Ezzel szemben az eddigi módszerek nagy része csak korlátozott számú fajnál alkalmazható. A szűrési eljárás csak a fonalásoknál megbízható, az antibiotikus módszerek csak az érzékeny törzseknél alkalmazhatók.

- 2/ Valamennyi olyan mutáns dúsitására alkalmasnak látszik, ahol szelektíven "korkülönbség" hozható létre a vad és mutáns sejtek között. A korábbi módszerek között van olyan, amelyik csak egy vagy néhány típusú mutáns dúsitására alkalmas, például az éheztetéses módszerek vagy a szupresszor mutációra alapított módszerek /Reissig, 1960/. A szűréses dúsitásnál is megfigyelték, hogy bizonyos vitamin-igényes mutánsok elpusztulnak a hosszú inkubáció alatt /Woodward, De Zeeuw és Srb, 1954/.

- 3/ Viszonylag magas a hatékonysága. A szűréses módszerrel a mutánst körülbelül 10 %-ra lehet dúsitani /Catcheside, 1954/. Magnet /1965/ 2-desoxyglukózzal 8 %-ról 46 %-ra dúsitott Schizosaccharomyces pombe mutánsokat. McDonald /1968/ Penicillium chrysogenum-nál nystatinnal 1 %-ról 17,3 %-ra, Bal, Balbin és Pieniazek, /1974/ a legjobb esetben Aspergillus nidulansnál N-glycosil-polifunginnal 1000-szeres, Cook /1974/ Rhodotorula mucilaginosánál nystatinnal 100-szeres, Snow /1966/ Saccharomyces cerevisiae-nél nystatinnal 1000-szeres dúsulást ért el. Donkersloot és Mateles /1968/ tríciummal jelölt aminosavak felhasználásával 4,7 %-ról 25 %-ra dúsitott.

- 4/ Egyszerű, gyors, nem munkaigényes módszer. A szűréses dúsitásnál a szuszpenzió hajtatása, 6 és 12 óránkénti szűrése sokkal munkaigényesebb. A tríciumos dúsitás mintegy 7-8 napig tart. Természetesen az antibiotikus eljárások néhány órás vagy perces kezelési idejénél viszont lassúbb.

- 5/ Nem károsítja a túlélő sejteket szemben számos antibiotikumos módszerrel. Gyakori jelenség, hogy az antibiotikumos kezelést túlélő sejteknél megnő a petite-mutánsok száma. /Moat, Peters és Srb, 1959/
- 6/ Az enzimekezelést megelőző inkubáció során a mutáns sejtek is elszaporodnak, ami izolálásuk valószínűségét megnöveli. A kezelést túlélő fenotípusosan vad sejtek között gyakran előfordul, hogy szaporodásuk során szégregáció révén mutáns utódok jelennek meg. Ezzel a módszerrel ezek is izolálhatók. Az említett előnyök hiányoznak például a szűréses módszernél.
- 7/ Az enzimek beszerzése és előállítása egyszerű és olcsó.

Az enzimes mutánsdúsítási módszer feltehetőleg kombinálható lesz más módszerekkel is. Bizonyos értelemben az enzimek és a DG együttes felhasználása is felfogható két dúsítási eljárás kombinált alkalmazásának. Hasonlóképpen más mérgek és antibiotikumok is fokozhatják az enzimes módszer hatásfokát. Az ilyen kombinációk megnövelhetik az alkalmazhatósági területet is. Például sztatikus hatású antibiotikumokkal szemben érzékeny mutánsok is izolálhatók lesznek szelektív felbontás segítségével. A rezisztens törzs sejtjeihez antibiotikumot adva megfelelő koncentrációban a sejtek túlnyomó többsége zavartalanul szaporodik. Az érzékeny mutánsok növekedését azonban az antibiotikum gátolja, és azok öregedve fokozatosan ellenállóak lesznek az enzimmel szemben. Az enzimekezelés majd az antibiotikum eltávolítása után a túlélő sejtek nagy része várhatóan érzékeny mutáns lesz.

A módszer elve valószínűleg felhasználható a gombákon kívül más élőlényeknél is, ahol az enzimes falbontás és protoplasztképzés lehetséges. A baktériumoknál a legáltalánosabban használt mutánsdúsítási eljárás a penicillin szelektív hatásán alapul, azonban a gombákhoz hasonlóan itt is határt szab az alkalmazhatóságnak az antibiotikummal szembeni rezisztencia. Lizozimmal és más falbontó hatású enzimekkel feltehetőleg sokkal széleskörűbben alkalmazható dúsítási módszer dolgozható ki. Enzimek segítségével állítanak elő protoplasztokat növényi sejtekből is. Az ismertetett módszerhez hasonló eljárással itt is jelentősen megnövelhető a mutációk izolálásának hatékonysága. Szövettenyészetek sejtjeit mutagén kezelés után megfelelő körülmények között enzimekkel feltehetőleg elérhető a vad sejtek szelektív pusztítása. Mivel egyes növényekből képezhető szövettenyészet úgy, hogy a növény a későbbiek során a szövettenyészetből visszaregenerálható, az enzimes mutánsdúsításnak a gyakorlati növénynemesítésben is fontos szerepe lehet.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

Gombamutánsok izolálását elősegítő szelekciós feldúsítási módszert dolgoztam ki *Schizosaccharomyces pombe* teszt-mikroorganizmus felhasználásával. A módszert kipróbáltam *Geotrichum candidum*mal, *Saccharomyces cerevisiae*vel és *Candida albicans*-szal is. A módszer a gombák sejtfalának szelektív enzimes bontásán alapul.

Az éticsiga /*Helix pomatia*/ gasztrális üregéből nyert emésztőnedv log-fázisban levő gombatenyészetek sejtjeinek falát feloldja és megfelelő körülmények között protoplasztok jönnek létre. A csupán membránnal határolt sejtek a sejten belülinél alacsonyabb ozmotikus értékű közegben a víz beáramlása miatt felduzzadnak és szétesnek. Stacioner-fázisban levő tenyészetek sejtjei ellenállóak az enzimhatással szemben. Ezen a megfigyelésen alapul az új mutánsdúsítási eljárás. Auxotróf mutánsok számára összeállítható olyan táptalaj, amelyen a mutánsok képtelenek növekedni és szaporodni, viszont ugyanott a prototróf sejtek fejlődnek és osztódnak. Kevert populációjukat ilyen táptalajon inkubálva elérhető az az állapot, amikor a mutáns sejtek stacioner-fázisban, a vad sejtek pedig log-fázisban vannak. Ekkor alkalmazva egy enzimkezelést hypotóniás közegben, a vad sejtek fala feloldódik és a sejtek szétesnek, a mutánsok pedig életben maradnak. Hasonló elven minden olyan mutáns feldúsítható, amely növekedése a tenyésztési körülmények változtatásával szelektíven gátolható a mutáns és vad sejtek kevert populációjában. A módszert 1:1 és 100:1 arányban összekevert vad és mutáns sejtekkel, mint modellel dolgoztam ki. A modellkísérletekben átlagosan 39,1-szeres dúsulást értem el.

Schizosaccharomyces pombe 18 auxotróf mutánsának izolálásánál alkalmaztam sikerrel az enzimes dúsitási módszert. Átlagosan 79,6-szoros dúsulást értem el. Három magas hőmérsékletre érzékeny mutáns izolálásánál a módszer 80,5-szörös dúsulást eredményezett.

A modellkísérleteket a többi teszt-mikroorganizmussal is elvégeztem és hasonló eredményeket kaptam.

A további kísérletekben a módszer hatékonyságát fokoztam. Az enzimkezelés megismétlésével sikerült elérnem, hogy a dúsitott populáció 95,2 %-át mutáns sejtek alkották. Ez 90,1-szeres dúsulásnak felelt meg. Más módon, a sejtfal szintézisének gátlásával is fokozható a hatékonyság. Ha a sejteket a csigaenzim hozzáadása előtt 2-desoxyglukózzal kezeltem rövidebb enzimkezeléssel is magasabb mértékű, átlagosan 167,5-szörös dúsulást értem el.

A csigaenzimen kívül Trichoderma viride és Streptomyces halstedii enzimeivel is sikerült szelektív sejtfalbontást és pusztítást elérnem. Trichoderma-fermentlével elvégzett modellkísérletekben maximálisan 421,1-szeres dúsulást kaptam.

A korábbi dúsitási módszerekkel összehasonlítva az enzimes módszer a gombáknál általánosan használható, a mutánsok szempontjából kiméletes, gyors, egyszerű és olcsó eljárás.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

1. Bacon, J. S. D., Jones, D., Farmer, V. C., Webley, D. M.: The occurrence of /1-3/ glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and *Polyporus* species, and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* 158: 313-315, 1968.
2. Bal, J., Balbin, E., Pieniasek, N. J.: Method for isolating auxotrophic mutants in *Aspergillus nidulans* using N-glycosyl-polifungin. *J. Gen. Microbiol.* 84: 111-116, 1974.
3. Biely, P., Krátky, Z., Kovařík, J., Bauer, Š.: Effect of 2-deoxyglucose on cell wall formation in *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to cell growth inhibition. *J. Bacteriol.* 107: 121-129, 1971.
4. Birnboim, H. C.: New method for extraction of ribonucleic acid and polyribosomes from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 107: 659-663, 1971.
5. Bush, D. A., Horisberger, M., Horman, J., Wursch, P.: The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* 81: 199-206, 1974.
6. Catcheside, D. G.: Isolation of nutritional mutants of *Neurospora crassa* by filtration enrichment. *J. Gen. Microbiol.* 11: 34-36, 1954.
7. Cook, K. A.: Regulation of aromatic metabolism in fungi: selection of mutants of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* with Nystatin. *J. Gen. Microbiol.* 85: 29-36, 1974.
8. Donkersloot, J. A., Mateles, R. J.: Enrichment of auxotrophic mutants of *Aspergillus flavus* by tritium suicide. *J. Bacteriol.* 96: 1551-1555, 1968.
9. Eddy, A. A., Williamson, D. H.: A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature*, 179: 1252-1253, 1957.
10. Ferenczy, L., Sipiczki, M., Szegedi, M.: Enrichment of fungal mutants by selective cell-wall lysis. *Nature* 253: 46-47, 1975.

11. Fincham, J. R. S., Day, P. R.: Fungal genetics. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1971.
12. Fries, N.: Experiments with different methods of isolating physiological mutations of filamentous fungi. Nature 159: 199. 1947.
13. Foury, F., Goffeau, A.: Combination of 2-deoxyglucose and snail-gut enzyme treatments for preparing sphaeroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. J. Gen. Microbiol. 75: 227-229. 1973.
14. Garcia-Mendoza, C., Villanueva, J. R.: Production of yeast protoplasts by an enzyme preparation of *Streptomyces* sp. Nature 195: 1326-1327. 1962.
15. Gaja, J.: Emploi des ferments dans les études de physiologie cellulaire. Le globule de levure dépouillé de sa membrane. C. R. Soc. Biol. Paris 82: 713-720. 1919.
16. Hamilton, J. B., Calvet, J.: Production of protoplasts in osmotic mutant of *Neurospora crassa* without added enzyme. J. Bacteriol. 88: 1084-1086. 1964.
17. Holter, H., Ottolenghi, P.: Observations on yeast protoplasts. C. r. Trav. Lab. Carlsberg. 31: 409-422. 1960.
18. Johnson, B. F.: Dissolution of yeast glucan induced by 2-deoxyglucose. Exp. Cell Res. 50: 692-694. 1968.
19. Krátký, Z.; Biely, P., Bauer, Š.: Mechanism of 2-deoxy-D-glucose inhibition of cell-wall polysaccharide and glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 54: 459-467. 1975.
20. Lederberg, J., Lederberg, E. M.: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63: 399-406. 1952.
21. Lester, H. E., Gross, S. R.: Efficient method for selection of auxotrophic mutants of *Neurospora*. Science 129: 572. 1959.

22. Lubin, M.: Enrichment of auxotrophic mutant populations by recycling.
J. Bacteriol. 83: 696-697. 1962.
23. MacDonald, K. D.: The selection of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* with nystatin.
Genet. Res. 11: 327-330. 1968.
24. Megnet, R.: A method for the selection of auxotrophic mutants of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.
Experientia 20: 320-321. 1964.
25. Megnet, R.: Screening of auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces pombe* with 2-deoxyglucose.
Mutat. Res. 2: 328-331. 1965.
26. Megnet, R.: Effect of 2-deoxyglucose on *Schizosaccharomyces pombe*.
J. Bacteriol. 90: 1032-1035. 1965.
27. Moat, A. G., Srb, A. M.: Selection and isolation of yeast mutants using antibiotics.
Bact. Proc. p. 53. 1957.
28. Moat, A. G., Peters, N., Jr., Srb, A. M.: Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics.
J. Bacteriol. 77: 673-677. 1959.
29. Nečas, O.: The vitality of cell fragments of yeasts. II. Development changes in plasmatic droplets.
Folia Biol. 1: 104-112. 1955.
30. Nečas, O.: Regeneration of yeast cells from naked protoplasts.
Nature 177: 898-899. 1956.
31. Nurminen, T., Oura, E., Soumalainen, H.: Preparation of protoplasts from baker's yeast.
Soumen Kemistilehti B 38: 282-285. 1965.
32. Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D., Buffon, A. W. J.: The genetics of *Aspergillus nidulans*.
Advanc. Genet. 5: 141-239. 1953.
33. Poole, R. K., Lloyd, D.: Effect of 2-deoxy-D-glucose on growth and cell walls of *Schizosaccharomyces pombe* 972 h⁻.
Arch. Mikrobiol. 88: 257-272. 1973.
34. Reissig, J. L.: Forward and back mutations in the pyr3 region of *Neurospora*. I. Mutations from arginine dependence to prototrophy.
Genet. Res. 1: 356-374. 1960.

35. Salton, M. R. J.: Isolation of *Streptomyces* spp. capable of decomposing preparations of cell walls from various micro-organisms and of their lytic activities with those of certain actinomycetes and myxobacteria.
J. Gen. Microbiol. 12: 25-30. 1955.
36. Sentandreu, R., Elorza, M. V.: The biosynthetic pathway of yeast mannan glycoproteins.
In *Yeast, Mould and Plant Protoplasts*, pp. 187-204. Edited by J. R. Villanueva, J. Garcia Acha, S. Gascon and -f. Uruburu. London and New York: Academic Press. 1972.
37. Sentandreu, R., Elorza, M. V., Villanueva, J. R.: Synthesis of yeast wall glucan;
J. Gen. Microbiol. 90: 13-20. 1975.
38. Sentandreu, R., Northcote, D. H.: The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall.
Biochem. J. 109: 419-432. 1968.
39. Sietsma, J. H., Wouters, J. T. M.: Cell wall composition and "protoplast" formation of *Geotrichum candidum*.
Arch. Mikrobiol. 79: 263-273. 1971.
40. Snow, D. R.: An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "nystatin".
Nature 211: 206. 1966.
41. Stewart, T. S., Ballou, C. E.: A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis.
Biochemistry 7: 1855-1863. 1968.
42. Takashi, T.: Filtration methods for selecting auxotrophic mutants of flocculent type yeast.
Report Kihara Inst. Biol. Res. 10: 57. 1959.
43. Visnyovszky, É.: Új szelekciós eljárás hiánymutáns gombatorzseek izolálására és az aminosav-dependens törzsek gyakorlati felhasználásának lehetőségei.
Doktori értekezés, 1972.
44. Vries, O. M. H. de, Wessels, J. G. H.: Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*.
J. Gen. Microbiol. 73: 13-22. 1972.
45. Walt, J. P. van der: Criteria and methods used in classification. In *The Yeasts*, pp. 34-113. Edited by J. Lodder. Amsterdam and London: North-Holland Publishing Company. 1970.

46. Woodward, V. W., De Zeeuw, J. R., Srb, A. M.: The separation and isolation of particular biochemical mutants of *Neurospora* by differential germination of conidia followed by filtration and selective plating.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 40: 192-200. 1954.
47. Dubos, R., Avery, O. T.: Decomposition of the capsular polysaccharide of pneumococcus type III by a bacterial enzyme.
J. Exp. Med. 34: 51-71. 1931.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	1. oldal
Anyag és módszer	5. oldal
Az eredmények ismertetése	23. oldal
Megbeszélés	45. oldal
Összefoglalás	55. oldal
Irodalomjegyzék	57. oldal

Munkám befejeztével köszönetemet fejezem ki Dr. Ferenczy Lajos tanszékvezető docensnek a téma kijelöléséért, gyakorlati és elméleti útmutatásaiért.

Köszönettel tartozom Dr. Zsolt Jánosnak elméleti és gyakorlati tanácsaiért, Szegedi Mihálynak a munkám első részében nyújtott segítségéért és együttműködéséért, Hargitani Klárának és Sziráki Évának a kísérletek technikai kivitelezésénél tanúsított önzetlen segítségükért.