

SEJTMAGIZOLÁLÁS ÉS SEJTMAGÁTVITEL MIKROSZKÓPOS
GOMBÁKBAN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készítette:

VÁGVÖLGYI CSABA

József Attila Tudományegyetem
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

1990.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS	1.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3.
2.1. A gomba sejtmag	3.
2.2. Sejtmagizolálás mikroszkópikus gombákból	6.
2.3. <i>Aspergillus nidulans</i>	15.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17.
3.1. Mikroorganizmusok	17.
3.2. Táptalajok és tápoldatok	17.
3.3. Protoplaszt képzés	19.
3.4. Sejtmag izolálás	20.
3.5. Sejtmagfrakció analízise	24.
3.6. Sejtmagbeviteli kísérletek	29.
3.7. Magbevétel termékeinek vizsgálata	30.
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS	32.
4.1. A protoplaszt képzés körülményeinek optimalizálása	32.
4.2. Sejtmagizolálás körülményeinek optimalizálása	32.
4.3. Sejtmagfrakció analízise	43.
4.4. Sejtmagbeviteli kísérletek	51.
4.5. Magbeviteli hibridek analízise	55.

5. ÖSSZEFOGLALÁS 57.

6. IRODALOMJEGYZÉK 59.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ade ⁻	= adenin igény
CM	= malátás tápközeg
DAPI	= 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	= dimetilszulfoxid
DNS	= dezoxiribonukleinsav
EDTA	= etiléndiamin-tetraecetsav
<i>g_{max}</i>	= maximális <i>g</i> érték
HEPES	= N-2-hidroxietyl-piperazin-N'-2- etánszulfonsav
lys ⁻	= lizin igény
MM	= szintetikus minimál tápközeg
NADP	= nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
PABA	= p-aminobenzoésav
paba ⁻	= p-aminobezoesav igény
PEG	= polietilénglikol
PMSF	= fenil-metil-szulfonil-fluorid
PVP	= polivinil-pirrolidon
RNS	= ribonukleinsav
rpm	= fordulat/perc (revolution per minute)
SZMC	= Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény (Szeged Microbiological Collection)
VBM	= vitaminos Ballance-féle minimál tápközeg
VMM	= vitaminos szintetikus minimál tápközeg
y	= sárga konídiumszín

1. BEVEZETÉS

A mikroszkópikus gombák protoplasztjai - sejtfalettől megfosztott sejtjei - a biológiai kutatás számos területén kerülnek alkalmazásra. Ezek közül elsősorban a különböző élettani (falképződés vizsgálata), biokémiai vizsgálatokat (sejtfrakciók analízise, produkciós vizsgálatok) és a genetikai információ átvitelét megvalósító kísérleteket (protoplasztfúzió, organelum átvitel, transzformáció) kell megemlítenünk (Peberdy és Ferenczy, 1985; Peberdy, 1988). Ez utóbbi területen mind elméleti mind gyakorlati szempontból nagy jelentőségűnek bizonyult a protoplasztok alkalmazása ott, ahol az új genetikai kombinációk létrehozására más lehetőség nem volt. Így a fajok közötti keresztezésekben, vagy olyan gombákkal folytatott kísérletekben, ahol a szexuális ciklust nem ismerjük. A protoplaszt fúzió ezekben az esetekben is segíthette új genetikai kombinációk létrehozását.

A kontrolált fúzióban felhasznált törzseknek megfelelő, a fúziós esemény követését és a keletkezett hibridek szelekcióját biztosító (az esetek többségében auxotrófia) markerekkel kell rendelkezniük. Olyankor, ha az ilyen genetikai markerek (mutációk) bevitele a felhasznált törzsekbe előnytelen (Das és mtsi., 1989) használhatók az olyan különleges fúziós rendszerek, melyek nem kívánják meg a partnerek, vagy legalábbis

csak az egyik partner markerezettségét. Ilyen lehetőség a kémiai inaktiválás, a hőinaktiválás vagy az izolált organellek átvitele (Ferenczy, 1984).

Protoplasztok fúziója esetén a sejtmag és a mitokondrium genetikai állománya egyaránt bekerül a fúziós hibridbe, azaz mindkettő szempontjából nem szelektív átvitel valósul meg. Izolált sejtmagot alkalmazva a magi genetikai információ szelektíven vihető át recipiens protoplasztokba. Ilyen rendszer alkalmas lehet a sejtmag - mitokondrium kölcsönhatás tanulmányozására.

Megfelelő mennyiségű, ép és szennyeződéstől mentes sejtmag kinyerése ezeken kívül lehetőséget adhat más (pl. biokémiai) vizsgálatok elvégzésére is.

Munkánk céljaul tűztük ki, hogy megfelelő módszert találjunk *Aspergillus nidulans* (továbbiakban: *A. nidulans*) sejtmagjainak intakt állapotban történő kinyerésére. Vizsgálni kívántuk, hogy milyen körülmények és hogyan befolyásolják a sejtmagizolálás eredményét. Továbbá megkíséreltük megvalósítani az izolált sejtmagok bevitelét recipiens *A. nidulans* protoplasztokba.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A gomba sejtmag

A gombák tipikus eukarióta szervezetek, azaz membránnal határolt valódi sejtmagokat tartalmaznak (Bracker, 1967; Carter, 1978; Gull és Oliver, 1981). Összevetve ezeket a magasabbrendű eukariótákban (növények, állatok) található sejtmagokkal, az alapvető azonosságok mellett számos eltérést is találunk.

2.1.1. A sejtmag morfológiája

Magmembrán

A pórusokkal átllyuggatott magmembrán jellegzetes, a sejtben máshol elő nem forduló szerkezet, amely két, 7-8 nm vastagságú egységmembránból és a közöttük található perinukleáris térből áll (Schatten és mtsi., 1978). A külső membrán és az endoplazmatikus retikulum kapcsolatának eredményeként a magmembrán perinukleáris tere és az endoplazmatikus retikulum belső tere egymással összefüggő rendszert alkot (Franke és mtsi., 1981). A citoplazma és a nukleoplazma közötti kapcsolatot a mintegy 70-140 nm átmérőjű pórusok biztosítják (Severs és Jordan, 1978), melyek szerkezete (magpórus komplex) más eukariótákéhoz hasonló (Robinow és Marak, 1966; Unwin és Milligan, 1982). Megfigyelték

a sejtciklus alatt a pórukszám változását; ez utóbbi kétszeresére nőtt az osztódást megelőzően (Jordan és mtsi., 1977).

Magvacska (nukleolusz)

A kromoszómák egyikének meghatározott régiójához (nukleolusz organizátor) kapcsolódó magvacska (Singleton, 1953) belsejében mind a riboszómális RNS prekursorok (Sillevis Smitt és mtsi., 1973), mind a riboszóma alegységekhez hasonló ribonukleoprotein részecskék (Westergaard és von Wettstein, 1970) jelenlétét kimutatták. Belülről a magmembránhoz tapadva látható magvacska formája és mérete különböző lehet és a sejtciklus során is változik (Zickler, 1977).

Kromatinállomány

A kromatin kondenzációjával kialakuló kromoszómák megfigyelését, beleértve számuk citológiai meghatározását a gomba sejtmag kicsinysége (1-5 μm ; Griffin, 1981) megnehezíti. Ennek ellenére fény-mikroszkópos eljárással is több faj, így pl. *A. nidulans* (Elliott, 1960), *Neurospora crassa* (továbbiakban: *N. crassa*) (Raju, 1986), *Schizosaccharomyces pombe* (továbbiakban: *Sch. pombe*) (Umesono és mtsi., 1983), elkülönült kromoszómáit sikerült megfesteni.

A gomba kromatin nukleosómái más eukariótákhoz képest 20-40 bázispárral rövidebb DNS szakaszt (160-180

bp-t) tartalmaznak, mely különbség minden esetben az összekötő rész (linker) rövidebb voltából adódik (Horgen és Silver, 1978). A hiszton fehérjék közül is az összekötő résszel kapcsolódó H1 tekintetében vannak a legnagyobb különbségek, így pl. *Saccharomyces cerevisiae*-ben (továbbiakban: *S. cerevisiae*) H1-et nem csak hasonló fehérjét detektáltak (Certa és mtsi., 1984). A többi 4 féle hiszton (H2a, H2b, H3 és H4) általánosan megtalálható és felépítésük is nagyon hasonló (Bradbury és Matthews, 1981).

A különböző gombafajokból eltérő számú (20-120), változatos tulajdonságú és funkciójú (pl. regulátor és szerkezeti fehérjék, enzimek) nem hiszton fehérjét különítettek el (Horgen és Silver, 1978).

Az eukariótákra jellemző repetitív szekvenciák gombákban kevésbé gyakoriak (2-20%) mint más eukariótákban és általában kisebb kópiaszámmal (25-60) találhatók meg haploid genomként (Brooks és Huang, 1972; Timberlake, 1978).

2.1.2. A sejtmag osztódása

A gomba sejtmag osztódása több okból sajátos. A magmembrán - néhány kivételtől eltekintve - nem tűnik el, hanem intakt marad az osztódás alatt, így az osztódási folyamatok nem a citoplazmában szabadon, hanem a magon belül játszódnak le (Heath, 1978; Heath, 1980). Egyes esetekben a nukleolusz is folyamatosan

jelen van és oszlik meg az utódmagok között az osztódás során (Emerson, 1963). Az osztódási orsó végpontjaihoz csak az alacsonyabbrendű gombákban (Gymnomycota, Mastigomycota) kapcsolódik centriolum, a többiben (Amastigomycota) a magmembránnal szoros kontaktusban lévő ún. orsó csúcsi test található (Griffin, 1981). Ez az osztódást megelőzően megkettőződik és a mag ellentétes pólusaira vándorolva vesz részt az orsó kialakításában (Peterson és Ris, 1976). Az orsó felépítésében fő komponensként résztvevő tubulin gombák esetében colchicinre érzéketlen, ugyanakkor több más, a húzófonalak kialakulását gátló vegyület (pl. benomyl, nocodazole) ismert (Gull, 1981).

2.2. Sejtmagizolálás mikroszkópikus gombákból

Sejtmagokon morfológiai vizsgálatokat in situ is lehet végezni. Más kísérleteket (pl. magi fehérje, nukleinsav összetétel vizsgálata) ugyanakkor csak izolált sejtmagokon végezhetünk. A közölt eljárások többsége *Saccharomyces* sejtmagjainak tisztítását írja le, mely témakör ismereteit két tanulmány foglalja össze (Duffus, 1975; Ide, 1988). Hasonló összefoglaló fonalas gombákból történő magizolálásról nem készült.

A leírt eljárások - bármely gombáról legyen is szó - két csoportba oszthatók. Az egyik amikor intakt sejtekből indultak ki, a másik amikor sejtfaluktól

enzimatikusan megfosztott sejtekből (protoplasztok) izoláltak sejtmagot.

2.2.1. Sejtmagizolálás intakt sejtekből

Duffus (1968; 1969) *Sch. pombe* sejteket 1 M szorbitol, 20% glicerol tartalmú közegben lefagyasztva, Eaton pressben tárt fel. A homogenizátumból többszöri ülepitéssel majd lépcsős cukorgrádiensen különítette el a magokat.

Ezt az eljárást Bhargava és Halvarson (1971) módosította és alkalmazta *S. cerevisiae*-re. A leglényegesebb változtatás a feltáró puffer 5% polivinil-pirrolidonnal (PVP 40 000) történő kiegészítése (a magmembrán stabilizálása végett) és a feltárásnál French press alkalmazása volt. A magtisztítás itt is lépcsős szorbitolgrádiensen (2,6 M, 3,2 M) történt.

Gyakorlatilag ezt az eljárást követték változtatásokkal Wintersberger és munkatársai (1973) akik X-press-t használtak valamint Sajdel-Sulkowska és munkatársai (1974) akik a feltáró közegben PVP helyett Ficoll-t alkalmazva izoláltak *S. cerevisiae* sejtmagokat.

Fonalas gombák közül *N. crassa* micéliumából Reich és Tsuda (1961) írt le először sejtmagizolálást. A hifatömeget 0,35 M mannitolban mosva, homokkal el-

dörzsölve tárták fel, majd többszöri differenciál centrifugálással jutottak a magfrakcióhoz.

Munkres és munkatársai (1966) késes homogenizátor és gyöngyös malom egymásutáni alkalmazásával tártak fel *N. crassa* sejteket. A feltáró közegből (0,5 M szaharóz, 1 mM EDTA) itt is differenciál ülepitéssel különítették el a magokat a többi sejtalkotótól.

A két módszert kombinálva *N. crassa* konídiumaiból is sikerült sejtmagokat izolálni (Dutta, 1969).

A leggyakrabban alkalmazott eljárás *N. crassa* sejtmagjainak izolálására Hautala és munkatársai (1977) közleményére épül. A konídiumokat Sajdel-Sulkowska és munkatársai (1974) által használt feltáróközeg módosított változatában ($MgCl_2$, $CaCl_2$ és Triton X-100 kiegészítés) lefagyasztva, French pressben tárták fel. Omni-Mixerben (Sorvall) történő homogenizálás és néhány differenciál ülepités után a sejtmagokat lépcsős Ludox grádiensen különítették el.

Ezt az eljárást többször és többen finomították (Hautala és Giles, 1977; Krumlauf és Marzluf, 1978; Talbot és Russell, 1980).

Fusarium solani pisi sejtmagjait a lefagyasztott micélium Omni-Mixerben történő szétzúzásával és az így kapott homogenizátum kétlépcsős szaharóz grádiensen történő centrifugálásával izolálták (Podila és mtsi., 1988).

Gealt és munkatársai (1976) *A. nidulans* micéliumából izoláltak sejtmagot. A sejteket

lefagyasztott állapotban késes homogenizátorral tárták fel. A magfrakcióhoz differenciál ülepitések és 2,1 M szaharózon történő centrifugálás után jutottak.

Physarum polycephalum (továbbiakban: *P. polycephalum*) plazmodiális sejtjeiből történő magizolálást dolgozott ki, majd fejlesztett tovább egyéb sejtformákra Mohberg és Rusch (1964; 1971). A fal nélküli sejtformáknál a protoplasztok feltárásánál használt módszereket (ozmotikus szétejtés, detergenses kezelés), míg a falat fejlesztett amőbáknál French press kezelést alkalmaztak. A sejtmagtisztítás minden esetben többszöri differenciál ülepitésből áll.

Hasonló eljárással *Dictyostelium discoideum* (továbbiakban: *D. discoideum*) fal nélküli sejtjeiből is előállítottak magpreparátumot (Charlesworth és Parish, 1975).

2.2.2. Sejtmagizolálás protoplasztokból

Az ellenálló gomba sejtfalet feltörni csak olyan nagy mechanikai behatással lehet, amely a kiszabaduló organelumokat is roncsolja. A gomba protoplasztok képzésének kidolgozása (Eddy és Williamson, 1957) lehetővé tette a magot kevésbé károsító feltárások alkalmazását. A magizoláláshoz nagy mennyiségben szükséges protoplaszt képzésének optimális körülményei - megfelelő ozmótikum, mikolítikus enzim - törzsről törzsre változnak (Davis, 1985; Peberdy, 1985).

Az első, gombából történő sejtmagizolálást tartalmazó közleményben Eddy (1959) *S. cerevisiae* protoplasztjaiból ultrahang-kezelés hatására kiszabaduló és egyszerű centrifugálási lépésekkel gyűjtött "magi testeket" ír le.

Rozijn és Tonino (1964) alapközleménynek számító cikkükben *S. carlsbergensis* protoplasztjait ozmótikus sokk és detergens (0,02% Triton X-100) együttes alkalmazásával ejtették szét. Az ozmótikum nélküli feltáró közegben 8% PVP-vel biztosították a mag stabilitását. A sejtmagokat lépcsős szaharóz grádiensen (1,2, 1,5, 1,8 és 2,0 M) átülepítve tisztították.

S. fragilis protoplasztokat ozmótikum nélküli közegben szétejtve különböző polimerek (PVP, Ficoll, dextrán) stabilizáló hatását mutatták ki (May, 1971). A magfrakciót a polimeroldatból kicentrifugálva nyerték.

Az itt leírt polimertartalmú, ozmotikummentes feltáró közeget több módszerben alkalmazták a tisztítási protokoll kisebb nagyobb változtatásával (Wintersberger és mtsi., 1973; Lohr és mtsi., 1977; Lohr és Ide, 1979; Szent-Gyorgyi és Isenberg, 1983; Gross és mtsi., 1986)

Mann és Mecke (1980) a magizolálást végig hipoozmótikus oldatokat felhasználva végezték. Eljárásukban puffereelt 50%-os Ficoll-on átülepítve különítették el a sejtmagokat.

Összehasonlítva *S. cerevisiae* protoplasztokból detergens segítségével illetve hipoozmótikus közegben

történő szétejtésnél kiszabaduló sejtmagokat, az utóbbiak jobb morfológiai állapotát mutatták ki (Doi és Doi, 1974). A sejtmagokat két különböző, lépcsős szaharóz grádiens (1,2-2,0 M és 1,8-2,3 M) egymás utáni alkalmazásával tisztították.

Ide és Saunders (1981) *S. cerevisiae* protoplasztok ozmótikus szétejtéssel kapott lizátumát előreformált folyamatos Percoll grádiensen centrifugálva választotta szét.

Ozmótikum és polimer nélküli, detergenstartalmú homogenizáló oldatot és helyben formálódó Percoll grádienszt alkalmazó módszert is közöltek (Baum és Thorner, 1986).

Kamimura és munkatársai (1981) *S. cerevisiae* protoplasztjait Ficoll tartalmú, megközelítőleg izoozmótikus közegben French press segítségével tárták fel. A sejtmagokat többszöri differenciál centrifugálással tisztították.

Candida albicans (továbbiakban: *C. albicans*) protoplasztok ozmótikus sokkal illetve detergenses szétejtéssel nyert lizátumából lépcsős szaharóz grádiensen (1,0, 1,5 és 1,7 M) illetve differenciál ülepitéssel izoláltak sejtmagokat (Wills és mtsi., 1984). A magfrakció minden esetben kimutatható mennyiségű mitokondriális szennyeződést tartalmazott.

2.2.3. Izolált sejtmagok felhasználása

Az izolált sejtmagokkal elvégezhető vizsgálatok magukban foglalják a sejtmag egészének és különböző alkotórészeinek (pl. membrán, kromatin, magvacska) morfológiai, kémiai és funkcionális vizsgálatát.

Sejtmag izolátumból nyert kromatin *Micrococcus* nukleázzal történő emésztésével sikerült számos gomba nukleoszómalis szerkezetét tanulmányozni. Ily módon igazolták az ilyen strukturáltság meglétét és végezték el jellemzését pl. *S. cerevisiae* (Lohr és Van Holde, 1975; Gullov és Friis, 1978; Lohr és mtsi; Nelson és mtsi, 1977), *A. nidulans* (Morris, 1976) és *Penicillium chrysogenum* (Ramón és mtsi. 1987) esetében.

A nukleoszóma szerkezettel szorosan összefüggő hiszton fehérjéket is sok esetben ilyen preparátumból kitisztítva tanulmányozták. Így bizonyították pl. *S. cerevisiae* sejtagjaiban 4 (Wintersberger és mtsi, 1973; Certa és mtsi, 1984), *A. nidulans*-ban (Felden és mtsi, 1976), *D. discoideum*-ban (Charlesworth és Parish, 1975) és *P. polycephalum*-ban (Jockusch és Walker, 1974) 5 féle hiszton jelenlétét.

Gullov és Friis (1980a; 1980b) *S. cerevisiae* izolált sejtmagjaiból származó kromatinból mintegy 32 különböző nem hiszton fehérje elkülönítését és jellemzését végezte el.

Ezt a technikai megközelítést felhasználták számos esetben a magi DNS repetitív szekvenciáinak vizsgálatára is (Timberlake, 1978; Dutta és mtsi., 1980).

Az izolált gomba sejtmagok, illetve a belőlük kinyert kromatin kitűnő rendszernek bizonyultak az eukarióta transzkripció tanulmányozására. Így *S. cerevisiae* mindhárom RNS polimeráza által katalizált elongációt (Lohr és Ide, 1979; Jerome és Jaehning, 1986; Schulz, 1978) illetve a polimeráz I (Kempers-Veenstra és mtsi., 1985) és a polimeráz III (Ide, 1981) általi inicializációt is sikerült kimutatni. Ilyen rendszerben Tekamp és munkatársai (1979) kívülről bevitt (exogén) polimeráz I és III működését is megfigyelték. Hasonló transzkripciós kísérleteket *P. polycephalum* izolált sejtmagjaival is végeztek (Mittermayer és mtsi., 1966; Davies és Walker, 1977).

Míg a DNS-RNS-fehérje arányt, mint a magpreparátum minőségének egyik jellemzőjét, szinte mindig meghatározták, a mag más összetevőinek, például a lipideknek, kevesebb figyelem jutott. Izolált *S. cerevisiae* sejtmagok (Mann és Mecke, 1980) lipidtartalmának (10%), mintegy kétszeresét (22%) találták *C. utilis* magpreparátumában (Belov és mtsi., 1989). Mindkét esetben elsősorban különböző foszfolipidek fordultak elő nagy mennyiségben.

A magmembránnak nem csak összetételét, de átjárhatóságát is tanulmányozták. Tsuchiya és

munkatársainak (1988) sikerült plazmid DNS izolált *S. cerevisiae* sejtmagok általi felvételét kimutatni és a transzport aktív voltát bizonyítani.

Ez utóbbi munkában az izolált sejtmagot, mint intakt organelumot tanulmányozták. Hasonló a helyzet azokban a kísérletekben melyekben a sejtmag szelektív átvitele a cél. Mig más eukarióták esetében, így növényi (Lörz és Potrykus, 1978; Saxena és mtsi., 1986) vagy állati sejtekben (Kondorosi és Duda, 1980; Sukoyan és mtsi., 1985) az ilyen próbálkozások eredményesebbnek mondhatók, addig a gombáknál csak néhány sikeres kísérletről tudunk. Ezek mindegyike *S. cerevisiae* karyodukcióját (izolált sejtmagjainak átvitelét) valósította meg.

Ferenczy és Pesti (1982) adenin auxotróf petite protoplasztokból izolált sejtmagokat (Doi és Doi, 1974) multiauxotróf recipiens protoplasztokba jutattak. A bevitelt a korábban növényi protoplasztoknál bevált un. szendvics technika módosításával valósították meg. A bevitel kis gyakoriságú ($5 \cdot 10^{-7}$), de jól reprodukálható volt.

Becher és munkatársai (1982) donorként diploid élesztősejteket használtak. Hipoozmotikus közegben szétejtett protoplasztokból tisztított sejtmagokat (May, 1971; Mann és Mecke, 1980) PEG- Ca^{2+} fúziós rendszerrel vittek be recipiens protoplasztokba. Az átvitel gyakoriságát $2 \cdot 10^{-6}$ körülinek találták.

Maemura és munkatársai (1983) szintén protoplasztokból izolált multiauxotróf haploid sejtmagokat jutattak be a partner protoplasztokba. Az általuk alkalmazott 7% Ficoll-t is tartalmazó PEG- Ca^{2+} fúziós rendszerben $5 \cdot 10^{-6}$ - 10^{-7} körüli beviteli gyakoriságot értek el.

2.3. *Aspergillus nidulans*

A. nidulans előnyös tulajdonságai révén egyike a legalaposabban tanulmányozott mikroorganizmusoknak (Timberlake és Marshall, 1988). Könnyen tenyészthető változatos összetételű tápközegekben, köztük egyszerű táptalajokon is. Haploid, homotalliás szervezet, melynek szexuális életciklusa is ismert (Raper és Fennel, 1965). Nagyszámú, jól jellemzett törzse áll rendelkezésre különböző morfológiai, auxotrófia és rezisztencia markerekkel (Clutterbuck, 1974). A sokmagvú sejtfonalakkal szemben spórái (konídiumai) csak egy magot tartalmaznak. Genomjának kis mérete ($2 \cdot 10^7$ bp) megkönnyíti tanulmányozását (Bainbridge, 1971).

Az *A. nidulans* volt az a szervezet, amely segítségével Pontecorvo és munkatársai először tanulmányozták részleteiben a paraszexuális ciklust (Pontecorvo és mtsi., 1953). Ez azon történések összessége, melyek a szexuális cikluson kívül teszik lehetővé a genetikai rekombinációt (Caten, 1981). A

kiindulási lépés a heterokariótikus állapot létrejöhet a természetben is anasztomózissal vagy laboratóriumi körülmények között protoplaszt fúzióval (Ferenczy és mtsi., 1974). A protoplasztfúzió speciális esete a karyodukció (magátvitel) révén történő heterokarionképzés szintén egy paraszexuális folyamatnak tekinthető.

Az *A. nidulans* és más *Aspergillus* fajok esetében a protoplaszt fúziós technika eddig is igen eredményesnek bizonyult. Nagyszámú intra- és interspecifikus fúziós hibridet sikerült előállítani és számos esetben bizonyítani a teljes standard paraszexuális ciklus meglétét (Kevei és Peberdy, 1979; Kevei és Peberdy, 1984).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Mikroorganizmusok

A felhasznált törzsek az *A. nidulans* SZMC 1011 (eredeti jelzése: R-21, Hebrew University, Izrael) UV mutagenézisével előállított (Szegedi, 1976) kettős auxotrófok voltak.

Jelzésük:

A. nidulans SZMC 1156 (y, paba⁻, ade⁻)

A. nidulans SZMC 1157 (y, paba⁻, lys⁻)

3.2. Táptalajok és tápoldatok

Vitaminos szintetikus minimál (VMM) tápoldat
protoplasztképzéshez:

0,5 % (NH₄)₂SO₄

0,1 % KH₂PO₄

0,05 % MgSO₄·7H₂O

1 % glükóz

0,1 % Wickerham-féle vitaminkeverék

100 µg/ml PABA (p-aminobenzoésav)

Wickerham-féle vitaminkeverék (Wickerham, 1951):

0,2 mg folsav

0,2 mg biotin

20 mg PABA

20 mg riboflavin
 40 mg aneurin·HCl
 40 mg Ca-pantotenát
 40 mg niacin
 40 mg piridoxin·HCl
 200 mg inozitol
 100 ml desztillált víz

Vitaminos minimál tápoldat (Ballance és mtsi.,
 1983) magbeviteli kísérletekhez (VBM)

0,6 % NaNO_3
 0,052 % KCl
 0,152 % KH_2PO_4
 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 1 % glükóz
 0,1 % nyomelem törzsoldat
 0,1 % Wickerham-féle vitaminkeverék
 100 $\mu\text{g/ml}$ PABA

Nyomelem törzsoldat:

1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 8,8 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 0,15 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 0,1 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
 0,05 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 1 l desztillált víz

Malátás tápoldat (CM):

1 % malátakivonat

0,5 % élesztőkivonat

1 % glükóz

Táptalajok:

Alaptáptalaj készítéséhez 2 %, felülöntő táptalaj készítéséhez 1 % agarral egészítettük ki a megfelelő tápoldatot.

Stabilizált táptalajok:

A protoplasztok illetve a fúziós aggregátumok regeneráltatása 0,7 M KCl vagy 1,2 M szorbitol tartalmú izoozmótikus táptalajban történt.

3.3. Protoplaszt képzés

Malátás ferdeagaron 3 napig nevelt *Aspergillus* tenyészet G-2 szinterüveg szűrőn átszűrt konídium-szuszpenzióját kiegészített vitaminos minimál tápoldatba (VMM + 10 µg/ml adenin vagy 50 µg/ml lizin) oltottuk be ($\approx 10^5$ konídium/ml). A protoplasztokat a 24 óráig 30 °C-on 200 rpm-mel történő rázatás után kapott micéliumtömegből képeztük. A protoplasztképző elegy 0,45 µm pórusátmérőjű szűrőn (Millipore) sterilre szűrt 1,5 % csigaenzimet (= Protoplast forming enzyme; Boehringer) tartalmazott 0,7 M KCl-ban oldva. 1,5 órás inkubálás után, mely enyhe rázatás mellett 30 °C-on

történt a protoplasztokat G-2 szűrőn elválasztottuk a hifadaraboktól és centrifugálással gyűjtöttük (5 perc, 1500 g_{max}).

3.4. Sejtmag izolálás

3.4.1. Sejtfeltárás körülményeinek vizsgálata

A kísérletek során vizsgáltuk, hogy milyen összetételű közeget használhatunk a sejtek feltárása és az izolálási folyamat során. Kipróbáltuk, hogy a rendelkezésünkre álló feltárási eljárások közül melyek és milyen hatékonysággal alkalmazhatók a protoplasztok szétejtésére.

3.4.1.1. A feltáró közeg összetételének meghatározása

SZMC 1157-ből képzett protoplasztokból kapott homogenizátumot részekre osztva lecentrifugáltuk (10 perc, 4000 g_{max}) majd az üledékeket különböző összetételű oldatok kis térfogataiban szuszpendáltuk fel. A sejtmagok állapotát DAPI-val történő fluoreszcens magfestéssel (3.5.1) vizsgáltuk, 1 órányi jégfürdön történő inkubálást követően.

A feltáráskor, illetve a kísérletek más szakaszaiban használt különböző oldatkomponensek ozmótikus értékeit Vogel OM 801 fagyáspontcsökkenést mérő ozmométer segítségével határoztuk meg.

3.4.1.2. Sejtfeltárási eljárások

A mechanikai és kémiai feltárások vizsgálatát az optimálisnak bizonyult feltárópufferben (3.4.2.a.) végeztük. A sejtmagok állapotát fluoreszcens mikroszkópozással, a feltárás hatékonyságát pedig az épen maradt protoplasztok regeneráltatásával, illetve Bürker kamrás számolásával ellenőriztük.

A mechanikai feltáráshoz kipróbált eszközök:

French press (American Instrument Co.)

Ultrahangos dezintegrátor (Branson Sonifier B-30)

Potter homogenizátor (Braun)

A kémiai szétejtéshez kipróbált vegyületek:

Nisztatin (Chinoin)

Triton X-100 (Reanal)

Ozmótikus sokkal történő szétejtés vizsgálatát 18 %

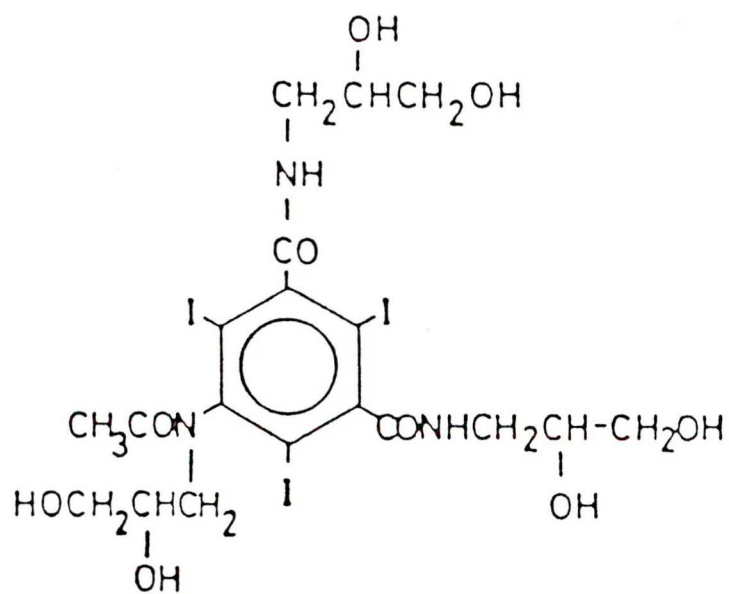
Ficoll, 30 mM HEPES (pH 7,0), 2 mM $MgCl_2$ összetételű közegben végeztük, különböző szorbitol koncentrációk mellett.

3.4.2. Sejtmag tisztítási módszerek

(a) Az általunk kidolgozott sejtmagtisztítás menete a következő: rázatott tenyészetből képzett, centrifugálással gyűjtött protoplasztokat (3.3.1.a.) 0,7 M KCl oldatban kétszer mostuk, számukat Bürker kamrában meghatároztuk. A további lépéseket 0-4 °C-on végeztük. Centrifugálás után (5 perc, 1500 g_{max}) feltárópufferben (1 M szorbitol, 7,5 % Ficoll, 10 %

glicerol, 2 mM MgCl_2 , 10 mM 2-merkaptóetanol, 1,5 mM PMSF, 30 mM HEPES-KOH pH 7,0) milliliterenként $5 \cdot 10^7$ - 10^8 protoplasztot felfuszpendáltunk. A protoplasztokat egyszeri French press kezeléssel (3000 psi) feltártuk, homogenizálópufferrel kétszeresére kihígítottuk és 20 percig 14 500 g_{max} -al centrifugáltuk. Az üledéket, mely a sejtmagokat is tartalmazta, felfuszpendáltuk 3 ml homogenizáló pufferben (0,5 M szorbitol, 16 % Ficoll, 5 % glicerol, 2 mM MgCl_2 , 10 mM 2-merkaptóetanol, 1,5 mM PMSF, 30 mM HEPES-KOH pH 7,0) és néhányszor óvatosan homogenizáltuk kézi üveg homogenizátorban (Dounce tissue grinder, résméret: 0,06-0,14 mm, Wheaton). A homogenizátumot Nycodenz (5-(N-2,3-dihidroxipropil-acetamido)-2,4,6-trijodo-N,N'-bis(2,3-dihidroxipropil)-izoftálamid; Nycomed Pharma; 1. ábra) sűrűséggrádiensre rétegeztük és kiperdülő rotorban (SW-35) 1,5 óráig 85 000 g_{max} -al centrifugáltuk (VAC 601, Janetzki). A grádiens készítéséhez homogenizáló pufferben (kivéve PMSF) oldott 35 %, 26,25 %, 21,88 %, 17,5 % és 8,75 % Nycodenz 3, 4, 4, 4 és 4,2 milliliterét egymásra rétegeztük és 20 °C-on 1 napig függőleges helyzetben diffundáltattuk.

(b) Néhány kísérletben ún. durva magpreparátumot használtunk. Készítésénél SZMC 1157 protoplasztokat nisztatin (150 $\mu\text{g/ml}$, 10 perc), Triton X-100 (0,1 %, 1 perc) kezeléssel illetve ozmótikus sokkal (18 % Ficoll,



1. ábra: Nycodenz szerkezeti képlete

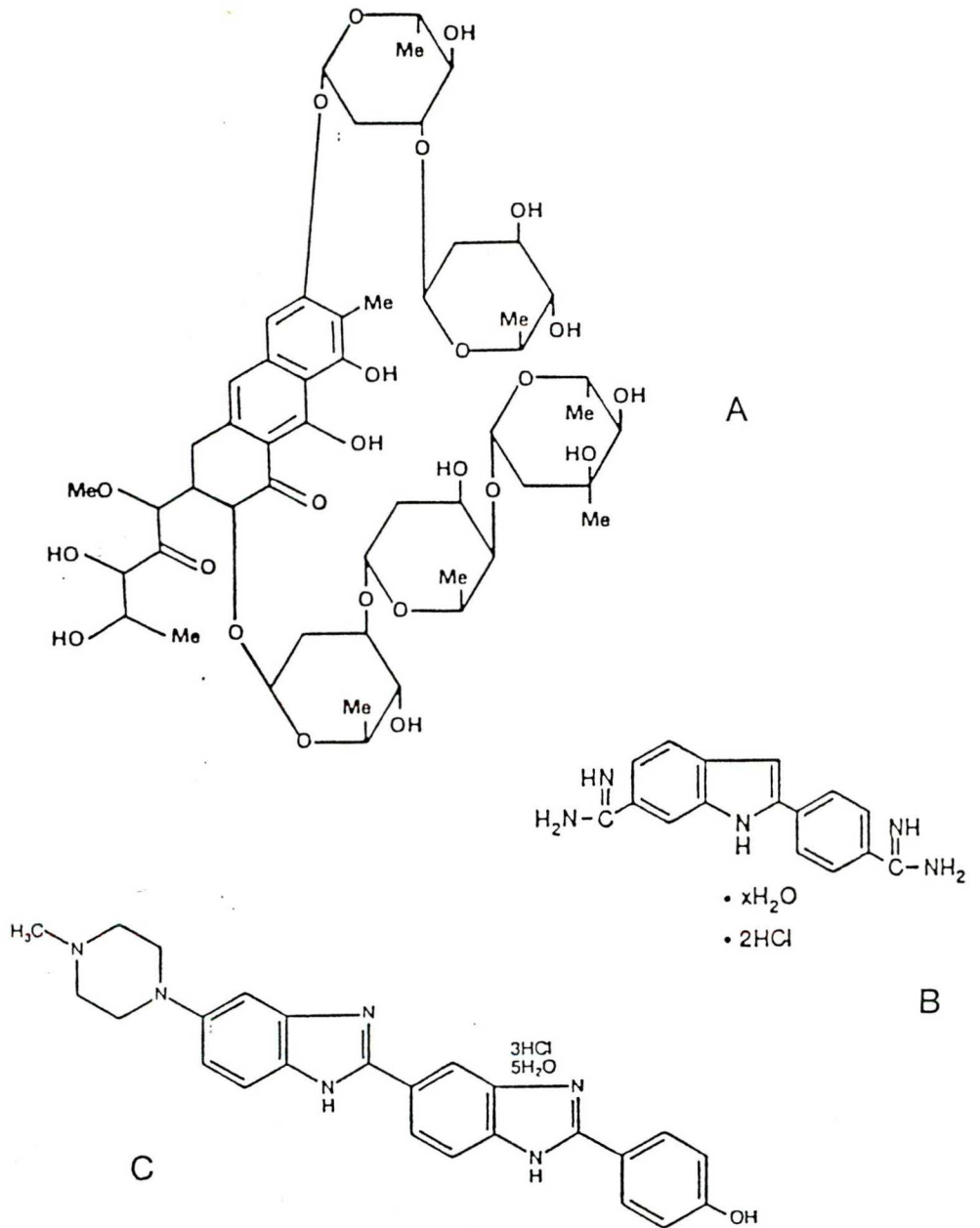
2 mM $MgCl_2$, 30 mM HEPES pH 7,0) szétejtettük és centrifugálás után feltárápufferben szuszpendáltuk.

3.5. Sejtfrakció analízise

3.5.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok

A gomba sejtmagok fénymikroszkópos vizsgálatára kis méretük miatt elsősorban a fluoreszcens mikroszkópos eljárás jöhet számításba (Butt és mtsi., 1989). A kísérletek során használt fluoreszcens magfestékek a mitramicin (Slater, 1976), a DAPI (Martegani és Trezzi, 1979) és a Hoechst Dye 33258 ((Kangatharalingam és Ferguson, 1984) voltak (2. ábra). Ha sejtfalfestés szükséges volt (fonalak festése), ehhez Calcofluor (Gull és Trinci, 1974) festékolatot használtunk.

A hifafonalak és protoplasztok fixálása 1,25 %, 2,5 % és 5 % glutáraldehiddel történt 20-20 perces kezelési idővel. Az izolált sejtmagok festése fixálás nélkül történt. A feltárápufferben oldott magfestékeket azonos térfogatban, a Calcofluor oldatot tizedtérfogatban a mintához adva fonalak vagy protoplasztok esetében 1-2 órás (4 °C-on), izolált sejtmagok festésekor pedig 2-10 perces várakozás után vizsgáltunk. A megfestett preparátumokat Jena Zeiss Jenalumar mikroszkóppal tanulmányoztuk előszűrőként U205g és B228g, utószűrőként pedig G251 filtert használva.



2. ábra: Fluoreszcens magfestékek szerkezeti képletei:

A = Mitramicin

B = DAPI

C = Hoechst Dye 33258

A felhasznált festék törzsoldatok:

Hoechst Dye 33258	10 $\mu\text{g/ml}$
DAPI	4 $\mu\text{g/ml}$
Mitramicin	0,4 mg/ml
	30 mM MgCl_2
	12,5 % etanol
Calcofluor	1 mg/ml

3.5.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Elektronmikroszkópos felvételek készítéséhez a mintát 4 °C-on, növekvő glutáraldehid koncentráció mellett fixáltuk (1,25 %, 2,5 % 30-30 perc majd 12 órán át 5 %). Na-kakodilát pufferben (0,1 M, pH 7,2) mostuk, majd jégfürdőben 1%-os ozmium tetroxiddal 1 órán át utófixáltuk. A mintákat pufferben kétszer mostuk, alkoholsoron (30-100 %) víztelenítettük. A beágyazás Durcupan (Fluka) műgyantába történt. A metszeteket uranil acetátos és ólom citrátos festés után Tesla BS 500 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3.5.3. Kémiai összetétel meghatározása

3.5.3.1. Nukleinsavak, fehérjék kivonása

A nukleinsav és fehérje extrakciót Herbert és munkatársai (1971) által leírtak szerint végeztük. A mintákat jéghideg perklórsavval (PCA) keverve (végkoncentráció 0,25 M) 25 percig jégen tartottuk. Centrifugálás után (10 perc 4000 g_{max}) az üledéket 0,5

M PCA-val, majd 95 %-os etanollal végül újra 0,5 M PCA-val mostuk. A nukleinsavakat kétszeri, 0,5 M PCA-val 20 percig 85 °C-on történő extrakcióval vontuk ki. A fehérje kivonása a visszamaradt üledék 1 M NaOH-al 1 óráig 60 °C-on történő kezelésével történt.

3.5.3.2. DNS tartalom meghatározása

A DNS mérés Giles és Myers (1965) módszerével történt, mely a difenilaminnak a 2-dezoxiribózzal adott színreakcióján alapul.

Mérés: 2 ml reagenst 2 ml mintával elkevertünk. 18 órai 30 °C-on történő inkubálás után meghatároztuk a minták 595 és 700 nm-nél mért extinkcióinak a különbségét.

Reagens: 4 % difenilamin jégcetben oldva, kiegészítve 20 ml-enként 0,1 ml 1,6 %-os acetaldehid oldattal.

DNS standardként 0,5 N PCA-ban oldott hering sperma DNS-t (Sigma) használtunk.

3.5.3.3. RNS tartalom meghatározása

Az RNS tartalom meghatározása Schneider (1957) módszerével történt, mely az orcinolnak a pentózokkal adott színreakcióján alapul.

Mérés: 2 ml mintához 2 ml reagenst adtunk, majd 20 percnyi forró vízfürdőben történő inkubálás után 660 nm-mél extinkciót mértünk.

Reagens: 0,5 % FeCl_3 és 1 % orcinol (Merck) tömény sósavban oldva.

RNS standardként 0,5 N PCA-ban oldott liofilizált RNS preparátumot (Torula yeast, Sigma) használtunk.

3.5.3.4. Fehérje tartalom meghatározása

A Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 fehérjéhez kötődésekor fellépő abszorpciós maximum eltolódáson (465 nm-ről 595 nm-re) alapuló módszert használtuk (Bradford, 1976).

Mérés: 0,1 ml mintához 4 ml reagenst adtunk, majd 20 perc elteltével 595 nm-en extinkciót mértünk.

Reagens: 100 mg CBB G-250 (Sigma), 50 ml 95 %-os etanol, 100 ml 85 %-os foszforsav, desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve.

Protein standardként 0.15 M NaCl-ban oldott Bovine serum albumint (Sigma) használtunk.

3.5.4. Enzimológiai vizsgálatok

A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G-6-PDH) aktivitásának mérése az enzimreakcióban résztvevő NADP redukciójának meghatározásán alapul. (Boehringer, 1975).

Mérés: 2,99 ml reakcióelegyhez 0,01 ml mintát adtunk és mértük a percenkénti extinkció növekedést 340 nm-en.

Reakcióelegy: 2,59 ml 0,1 M trietanolamin puffer (pH 7,6) kiegészítve 0,2 ml 0,1 M $MgCl_2$, 0,1 ml 35 mM glükóz-6-foszfát és 0,1 ml 11 mM NADP oldattal.

3.5.5. Regenerációs tesztek

A magfrakció ismert térfogatait desztillált vizes kezelés után, illetve kezelés nélkül ozmótikusan stabilizált (0,7 M KCl) felülöntőbe kevertük és stabilizált malátás táptalajra (CM) öntöttük. Az előbbi az intakt sejtek, az utóbbi az intakt sejtek és a protoplasztok együttes számának meghatározását tette lehetővé.

3.6. Sejtmagbevétel recipiens protoplasztokba

Sejtmagbevételi kísérletekhez a Nycodenz grádiensen kapott magfrakciót feltárópufferrel tízszeresére hígítottuk és 25 percig 14 500 g_{max} -al centrifugáltuk. A kiülepedett magokat óvatosan felszuszpendáltuk 1-1,5 ml feltárópufferben.

Durva magpreparátumot (3.4.2.b.) közvetlenül használtunk fel ilyen kísérletekben.

(a) PEG- Ca^{2+} fúzió: Az SZMC 1157 sejtmagokhoz 1:5-10 arányban SZMC 1156 protoplasztokat kevertünk 1-2 ml feltárópufferben. (Ezeket a protoplasztokat közvetlenül a felhasználás előtt képeztük.) Centrifugálás után (20 perc, 14 500 g_{max}) az üledéket 1 ml fúziós oldatban (30 % PEG 4000, 100 mM $CaCl_2$, 5 % DMSO) 5 percig jégen, majd 10-15 percig 20 °C-on inkubáltuk. A fúziós elegy 50-100

μ l-eit 3-3 ml, 42-45 °C-os, stabilizált felülöntő táptalajba (VAM + 0,7 M KCl) kevertük és ugyanilyen alap táptalajra öntöttük. A lemezeket 35 °C-on inkubáltuk.

(b) Elektrofúziós kísérletek: A Tanszéken épített elektrofúziós készülék 2 mm-es fúziós kamrájában a sejtmagokat és a recipiens protoplasztokat 100 μ l végtér fogatban kevertük össze. Sorbarendezés után (300 V/cm, 1 MHz, 90 sec) a fúziót 40-60 sec idejű, 800-1200 V közötti, exponenciálisan lefutó egyszeri impulzusokkal kíséreltük meg kiváltani. A táptalajba keverés és inkubálás az előzőek szerint történt. A recipiens protoplasztok (SZMC 1156) ozmótikumaként (képzésnél is) 1,2 M szorbitolt használtunk.

(c) Kontrol kísérletek: A magfrakcióval vagy durva magpreparátummal regenerációs teszteket (3.5.5.) végeztünk. A recipiens protoplasztok markereit és regenerációját ozmótikusan stabilizált VBM és CM táptalajokon ellenőriztük.

3.7. Fúziós termékek vizsgálata.

A stabilizált táptalajon kifejlődött telepeket morfológiai jellemzőik és biokémiai sajátosságaik alapján jellemeztük. Ez utóbbihoz a regenerálódott telepekből micéliumdarabkákat oltottunk át VBM táptalajra, majd az itt növekedésnek induló telepekből

különböző összetételű táptalajokra (VBM, kiegészített VBM, CM) micéliumdarabkákkal illetve konídiumokkal végeztünk leoltást.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS.

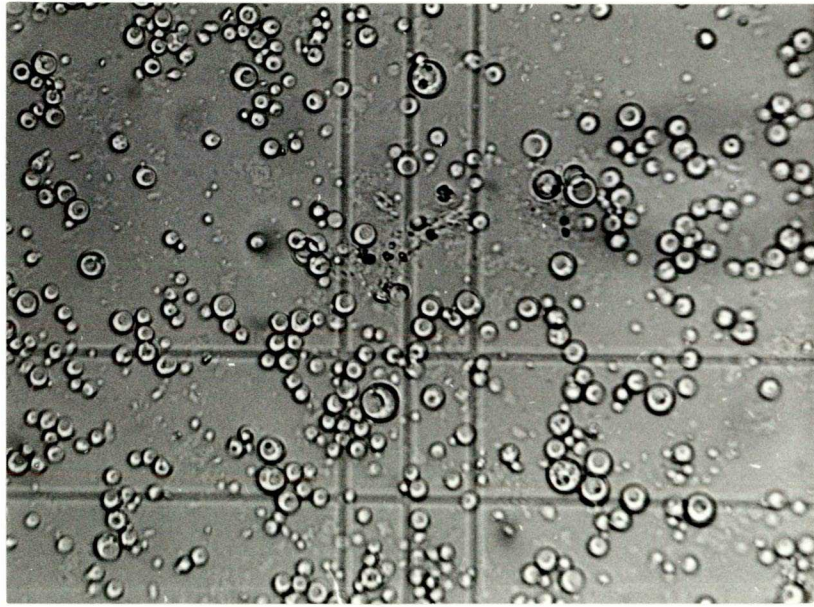
4.1. A protoplaszt képzés körülményeinek meghatározása

Annak ellenére, hogy az *A. nidulans*-ból történő protoplasztképzésre jól bevált módszerek ismertek, a korábbi sejtmagizolálási kísérletekben nem sikerült az ilyen munkához szükséges mennyiségben protoplasztokat képezni (Gealt és mtsi., 1976; Morris és mtsi., 1977). Mivel a kísérleteinkben kipróbált ún. celofános technikával (Ferenczy és mtsi., 1975), illetve van den Broek és munkatársai (1979) által kidolgozott folyadék tenyészetből kiinduló protoplasztképzéssel egyaránt a kívánatosnál kevesebb protoplaszthoz jutottunk, kidolgoztunk egy másik, folyadék tenyészetből történő protoplasztálást. Ezzel a módszerrel kedvező esetben lombikonként $\approx 1 \cdot 5 \cdot 10^8$ protoplaszt is előállítható volt (1. kép).

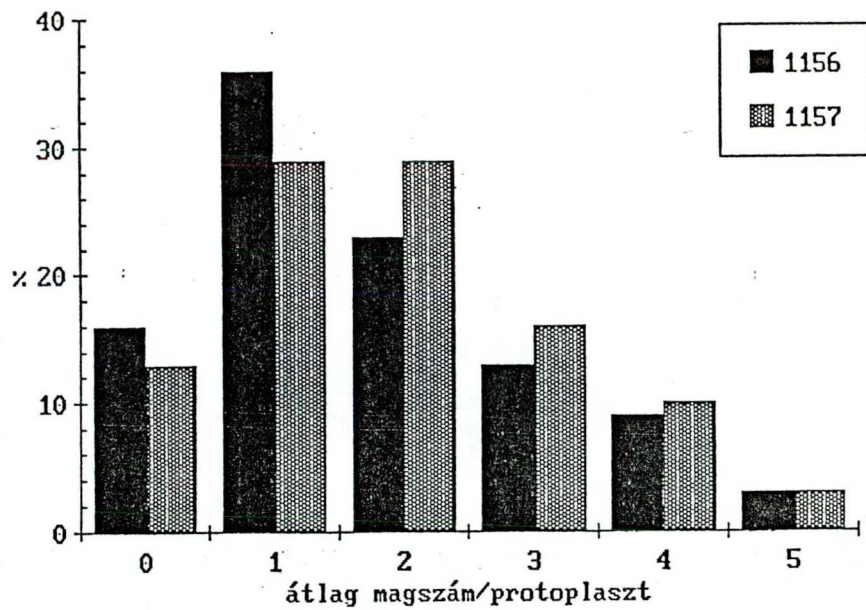
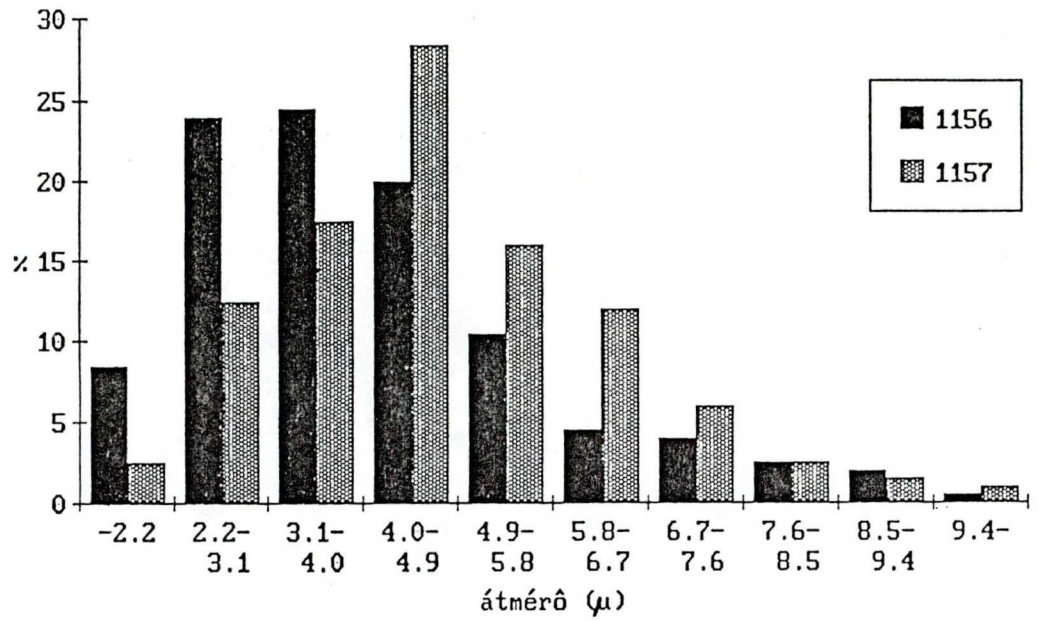
4.2. Sejtmagizolálás körülményeinek optimalizálása

4.2.1. Recipiens - donor kiválasztása

Meghatározva a felhasznált két törzs protoplaszt populációjának méretbeli megoszlását és a protoplasztonkénti átlagos magszámát (3. ábra), megállapítottuk, hogy az SZMC 1156 törzsből több kisméretű



1. kép: SZMC 1157 protoplasztok fénymikroszkópos képe



3. ábra: A = SZMC 1156 és SZMC 1157 protoplaszt
populáció méretbeli megoszlása

B = SZMC 1156 és SZMC 1157 protoplasztok
átlagos magyszáma

(4 μm -nél kisebb) és kisebb magszámú protoplaszt jön létre. Mivel ezt kedvezőtlennek találtuk a sejtmagok centrifugálással történő tisztításánál, a 1157-es törzset használtuk fel a magizolálásra.

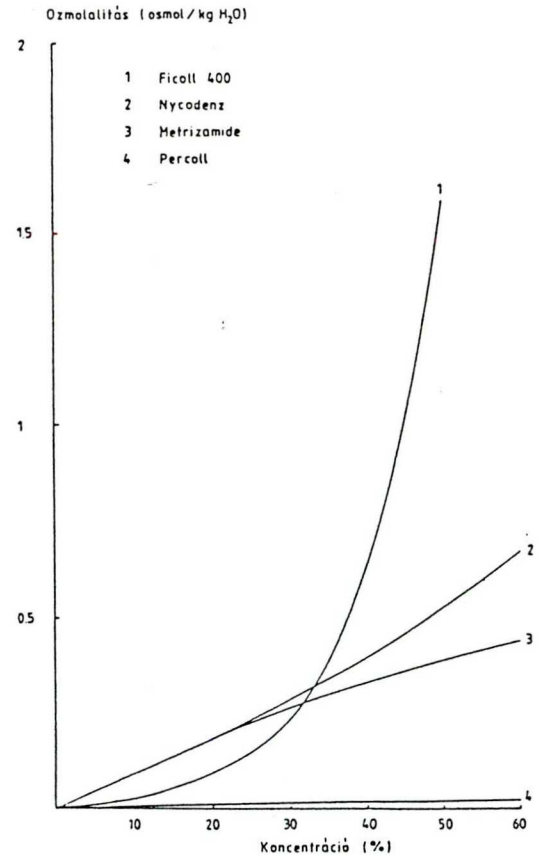
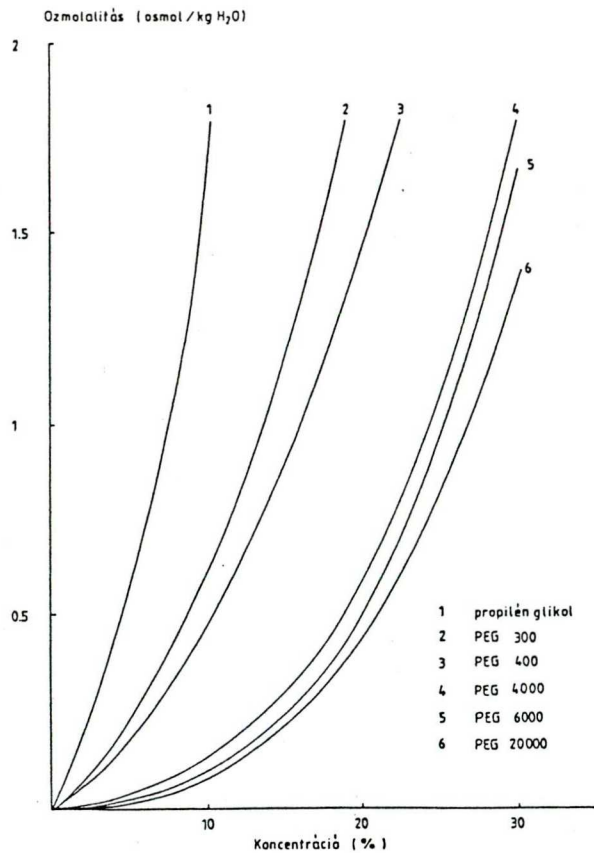
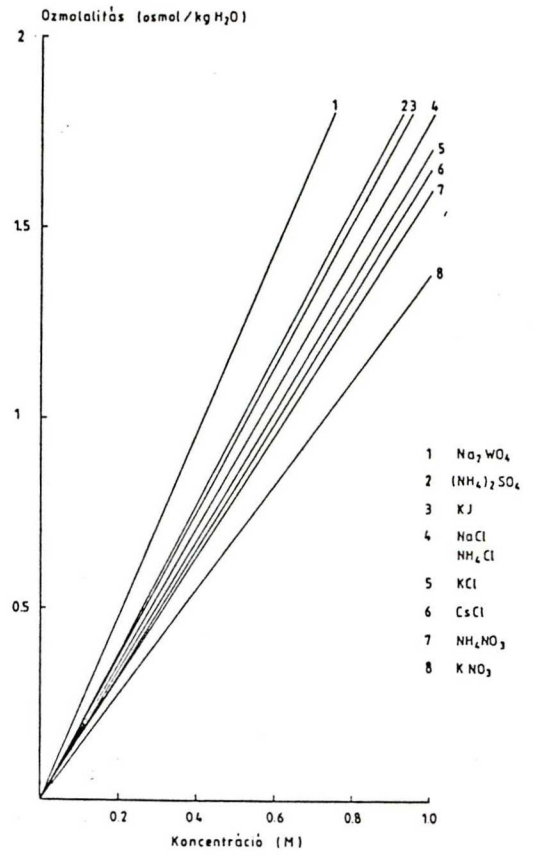
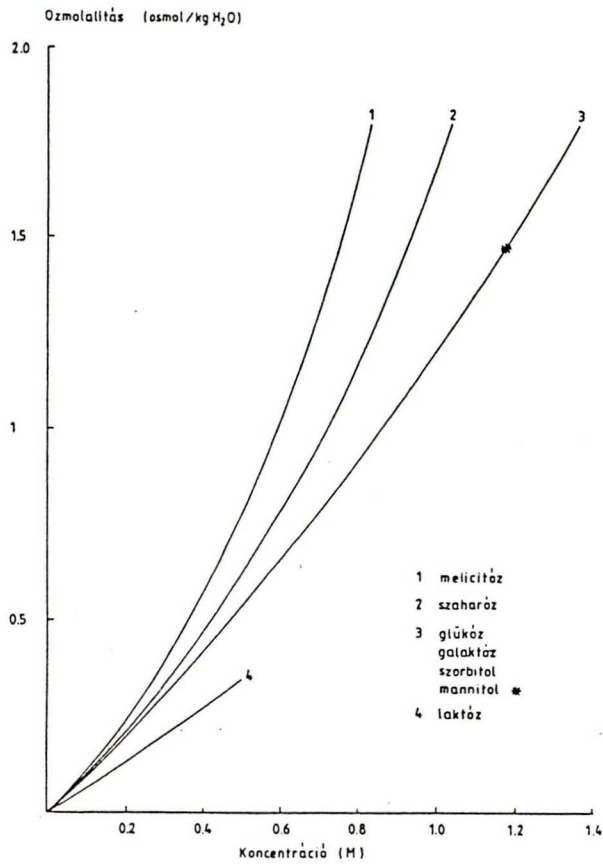
4.2.2. Feltáró - izoláló közeg optimalizálásának eredményei

A különböző oldatok ozmótikus viszonyainak ismerete mind a protoplasztokkal, mind a sejtmagokkal végzett műveletek során fontos, ezért meghatároztuk a felhasználni tervezett szerves és szervetlen vegyületek (pl. ozmótikus stabilizátorok, grádiens anyagok, fuzogén anyagok) ozmótikus értékeit (4. ábra).

A megfelelő feltáró - izoláló közeg jelenléte a sikeres magizolálás egyik legfontosabb feltétele. Az irodalomból meglehetősen ellentmondásos képet kapunk arról, milyen összetevőkből kell egy ilyen oldatnak állnia. A következő tényezők hatását vizsgáltuk meg részletesen: (a) ozmótikum fajtája és koncentrációja, (b) kétértékű ionok, (c) membránstabilizáló vegyületek, (d) grádiens anyagok jelenléte, (e) az oldat pH-ja.

(a) Ozmótikumként egy szervetlen (KCl) és egy szerves (szorbitol) vegyület hatását teszteltük.

KCl tartalmú feltárópufferben, mindegyik kipróbált KCl koncentráció mellett (0-1 M) a sejtmagok



4. ábra: Vegyületek ozmótikus értékei

morfológiailag sértetleneknek látszottak, bár kis koncentrációknál (0-0,5 M) 1 órás inkubáció után a magok duzzadását lehetett megfigyelni. Csak KCl-ot tartalmazó oldatban felszuszpendált sejtmagok kivétel nélkül szétestek. Ezen 1-2 mM Mg^{2+} hozzáadása sem változtatott lényegesen. Előnytelen hatása volt a KCl-nak, hogy elősegítette a különböző szubcelluláris elemek aggregációját, ami az elválasztási lépéseket zavarta.

A szorbitol hatását 0-3 M koncentráció-tartományban vizsgáltuk. 0,5-2 M között 1 órás inkubálás után is jól megőrzött sejtmagokat figyeltünk meg. Magasabb koncentrációban (3 M) ilyen inkubálás után a sejtmagok kisebbeknek, kompaktabbaknak látszottak. Csak szorbitolt tartalmazó oldatban egy részük rögtön sérült és az épen maradtak is nagyon érzékenyek bizonyultak mechanikai hatásokra. Mg^{2+} tartalmú (1-2 mM) szorbitol oldatban ez a sérülékenység sokkal kevésbé volt észlelhető.

(b) A vizsgált ionok (Ca^{2+} és Mg^{2+}) az izolált sejtmagokra gyakorolt hatásukat tekintve egyenértékűeknek bizonyultak. A feltárápufferben, 1-10 mM közötti koncentrációban fenntartották a mag normál morfológiáját és növelték a magok stabilitását. Ez a stabilizáló hatás Ficoll jelenlétében még ozmótikum nélkül is megtartotta a magok integritását, bár hosszabb inkubálás után alacsonyabb Mg^{2+}

koncentrációnál (1-2 mM) kismértékben duzzadtak. Magasabb koncentrációnál (20 mM), inkubálás után a magok jelentős része torzult, vagy szétesett. Kizárólag MgCl_2 -ban (0-20 mM) felfuszpendált sejtmagok gyors lizálását figyeltük meg. A magasabb Mg^{2+} koncentráció (10-20 mM) fokozta a sejtmagok aggregációs hajlamát egymással és egyéb sejtalkotókkal.

A megfelelő ionkoncentráció a magmembrán integritásának megőrzésén túl szükséges a kromatin kondenzált állapotban tartásához (Bradbury és Matthews, 1981) továbbá, befolyásolhatja a jelenlevő nukleázok aktivitását. *A. nidulans* ismert nukleázai (pl. DN-áz 4) elsősorban Mn^{2+} és Ca^{2+} jelenlétében aktívak (Campbell és Winder, 1983). Mivel jelentős nukleáz aktivitást találtak a sejtmaghoz kötve is (Koa és mtsi., 1990) csak a minimálisan szükséges kétértékű ionkoncentrációt célszerű alkalmazni.

Mindezek figyelembevételével az oldataink 2 mM-os koncentrációban tartalmaztak Mg^{2+} -ot.

(c) Kísérleteinkben Ficoll, PVP és glicerol magmembránra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Legalább 1 mM Mg^{2+} jelenlétében 12-18 % Ficoll ozmótikum nélkül is megtartotta a sejtmagok egységét, bár hosszabb inkubálás után azok észrevehetően duzzadtak. Ionok nélküli Ficoll oldat stabilizáló hatása sokkal kisebb volt. A Ficoll észrevehetően fokozta a sejtmagok rezisztenciáját különböző

mechanikai feltárások során is. Mindezek figyelembevételével az oldatainkban 7,5-15 % közötti koncentrációban alkalmaztuk.

A PVP (Ms: 40 000) és a Ficoll hatása lényegében hasonló volt. Tartósabb inkubálás után PVP tartalmú közegben több volt a sérült sejtmag, mint Ficoll jelenlétében.

A glicerol kisebb koncentrációkban (5-10 %) stabilizáló hatású volt. Ilyen koncentrációk mellett, Mg^{2+} jelenlétében szorbitol nélküli feltárópufferben megakadályozta a sejtmagok duzzadását. Nagyobb koncentrációban (20 %) azonban sok sejtmag lízisét figyeltük meg. Jelenléte a feltárópufferben csökkentette a feltárás alatt sérült sejtmagok számát.

(d) A sűrűséggrádiensek formálására használt Percoll és Nycodenz hatását vizsgáltuk. A feltárópufferben a Percoll jelenléte (0-35 %) semmilyen észlelhető hatást nem gyakorolt a megfigyelt sejtmagok morfológiájára. Hasonlóképpen a Nycodenz 0-40 % között 2 mM Mg^{2+} és 1 M szorbitol jelenlétében hosszabb inkubálás után sem okozott észlelhető változást. Csak Nycodenzet tartalmazó oldatban a sejtmagok gyorsan szétestek.

(e) A közeg pH-jának hatását 4,0 és 8,0 között vizsgálva az optimálisnak a 6,5-7,2 közötti tartomány bizonyult. Lúgosabb közegben 1 órás inkubálás a sejt-

magok jelentős részének szétesésével járt. Az optimálisnál savasabb közegben ilyen károsodásukat nem észleltük, de különösen pH 6,0 alatt fokozottan aggregálódtak. Előnytelen a lúgos közeg azért is, mert a korábban említett *Aspergillus* nukleázok mindegyikének pH optimuma 7 és 9 közé esik.

A megfelelő pH (7,0) biztosítására a HEPES-KCl puffert találtuk a legalkalmasabbnak, mert csak kis mértékben köt meg kétértékű ionokat.

4.2.3. Sejtfeltárási eljárások vizsgálata

Az ultrahanggal történő feltárás rendkívül hatékonyan ejtette szét a protoplasztokat (1. táblázat). Céljainkra ugyanakkor alkalmatlannak bizonyult, mert a kiszabaduló sejtmagok szinte kivétel nélkül már rövid kezelési idő (15 sec) alatt is szétestek.

kezelési idő (sec)	leadott teljesítmény (W)			
	35	70	105	140
15	3.1	2.2	0.4	0.2
30	1.5	0.9	0.1	<0.01
45	0.4	0.1	0.01	-
60	0.2	0.07	-	-

1. táblázat: Protoplaszt túlélés %-ban kifejezve ultrahangos feltárást követően.

A Potter-homogenizátorral történő protoplaszt feltárás eredményeiből látható (2. táblázat), hogy még maximális fordulatszám mellett is túl hosszú kezelési időre volt szükség, hogy elfogadhatóan kis túlélést kapjunk. Az ilyen tartós homogenizálás azonban a már kiszabadult sejtmagok nagy részének dezintegrálódásával jár.

kezelési idő (perc)	fordulatszám (rpm)			
	300	600	900	1200
1	94	82	65	56
2	68	53	37	22
4	34	27	15	10
8	22	15	4	3

2. táblázat: SZMC 1157 protoplaszt túlélés Potter-homogenizátorral történő feltárást követően %-ban kifejezve.

A French press kezelés megfelelő nyomáson már egyszeri feltárással is a protoplasztok döntő többségét szétejtette (3. táblázat). Bár a sejtmagok jelentős része is sérült, de mintegy 50 %-ukat a fény-mikroszkópos megfigyelés épnek mutatta a feltárás után. Kísérleteinkben ezért ezt a feltárási nódot alkalmaztuk.

kezelési szám	alkalmazott nyomás (psi ¹)			
	500	1000	2000	3000
1X	11	6	2	0.01
2X	10	2	0.4	<0.01
3X	6	1	0.1	<0.01

3. táblázat: Protoplaszt túlélés %-ban kifejezve French-press kezelést követően.

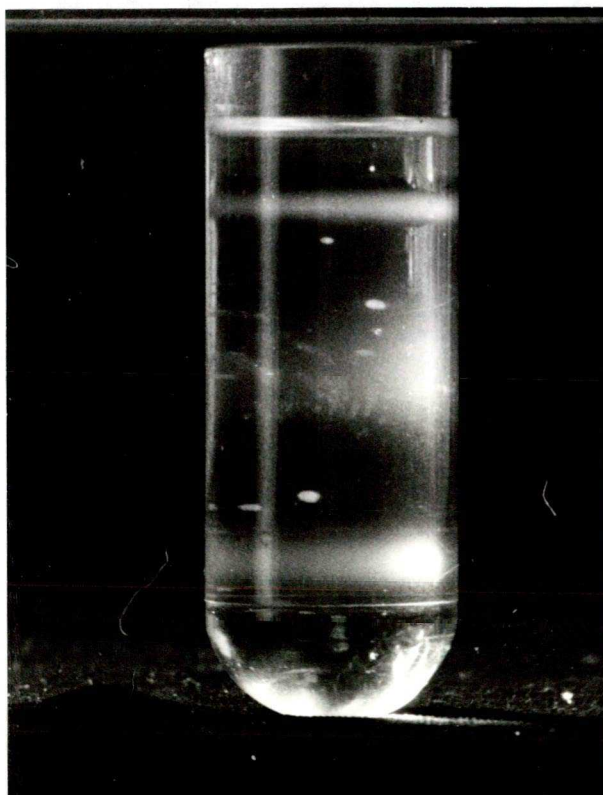
¹psi = pound per square inch

A kémiai úton és ozmótikus sokkal történő feltárást csak durva magpreparátummal folytatott kísérletekben használtunk. Itt azokat a körülményeket kellett meghatározni, amelyek teljes protoplaszt pusztulást eredményeztek. Nisztatinnal ez 150 µg/ml-es koncentrációval 10-12 perces kezelés után volt elérhető 4 °C-ok körül tartott mintában. Magasabb hőmérsékleten a szétesés jóval gyorsabb. Triton X-100 0,1 %-os koncentrációban 1 perc után adott tökéletes feltárást. Mindkét kezelés után jelentős számban voltak megfigyelhetők szétesett sejtmagok. Ozmótikus sokkal 5 perces kezeléssel értünk el tökéletes feltárást. Ebben a közegben a protoplasztokból kijutó magok mikroszkópos megjelenése normális volt.

4.2.4. Sejtmagizolálás eredményei

Korábban *S. cerevisiae* és *N. crassa* sejtmag izolálására leírt néhány módszert (Ide és Saunders, 1981; Kamimura és mtsi., 1981; Hautala és mtsi., 1977) illetve ezek számos módosítását is kipróbáltuk, de *A. nidulans*-ra kevésbé bizonyultak használhatónak.

A Nycodenz-t kedvező tulajdonságai (pl. biológiai inerttség, kis ozmótikus érték) alkalmassá teszik különböző elválasztásokban való felhasználásra (Rickwood, 1983; Vágvölgyi és mtsi., 1988; Vágvölgyi és mtsi., 1990). Az általunk kidolgozott módszerrel sikerült *A. nidulans* protoplasztokból tiszta, jó állapotban lévő sejtmagokat tartalmazó magpreparátumot nyerni. Esetünkben a Nycodenz grádiensen történő centrifugálás után a sejtmagok egy diffúz sávban, annak középső részében találhatók (2. kép). Az épen maradt protoplasztok és a citoplazmatikus maradványok (pl. mitokondriumok) nagy része a grádiens felső részén, míg a sejtfalas szennyeződés (hifadarabok) az alsó részen koncentrálódnak. A sejtmag kitermelést, néhány más módszer eredményével összevetve a 4. táblázat mutatja. Megfigyeléseink szerint a legnagyobb veszteséget a feltárás okozta, amikor is a sejtmagok mintegy 50 %-a károsodott.



2. kép: Nycodenz grádiens centrifugálás utáni képe

	Kitermelés(%)
<i>Aspergillus nidulans</i>	
Gealt és mtsi., 1976.	18,8
Vágvölgyi, 1990.	26
<i>Neurospora crassa</i>	
Dutta, 1969.	"low"*
Hautala és mtsi., 1977.	29
Hsiang és Cole, 1973.	46
Krumlauf és Marzluf, 1978.	67-75
Reich és Tsuda, 1961.	<10 ¹
<i>Physarum polycephalum</i>	
Mohrberg és Rusch, 1971.	40-50
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	
Rozijn és Tonino, 1964.	70-80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Bhargava és Halvorson, 1971.	46,7
Doi és Doi, 1974.	24
Kamimura és mtsi., 1981.	>20**
Mann és Mecke, 1980.	30
Sajdel-Sulkowska és mtsi., 1974.	30-40
Wintersberger és mtsi., 1973.	36
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
Duffus, 1968.	10-20
Duffus, 1969.	10

2. táblázat: Izolált sejtmagok kitermelése a tiszta magfrakcióban DNS mérés alapján.

*becsléssel

**magszámolással

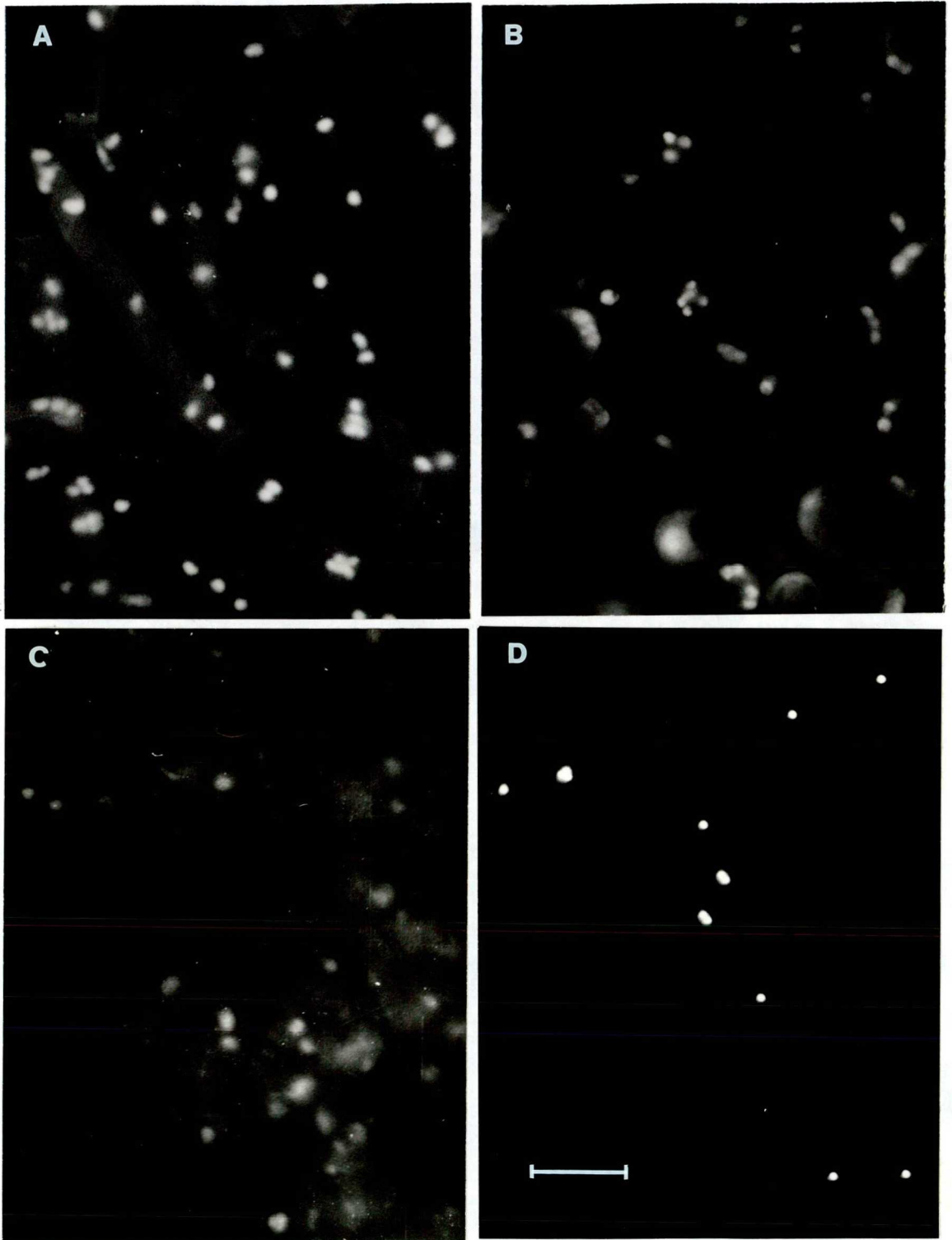
4.3. Nycodenz grádiensen nyert magfrakció analízise

4.3.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok

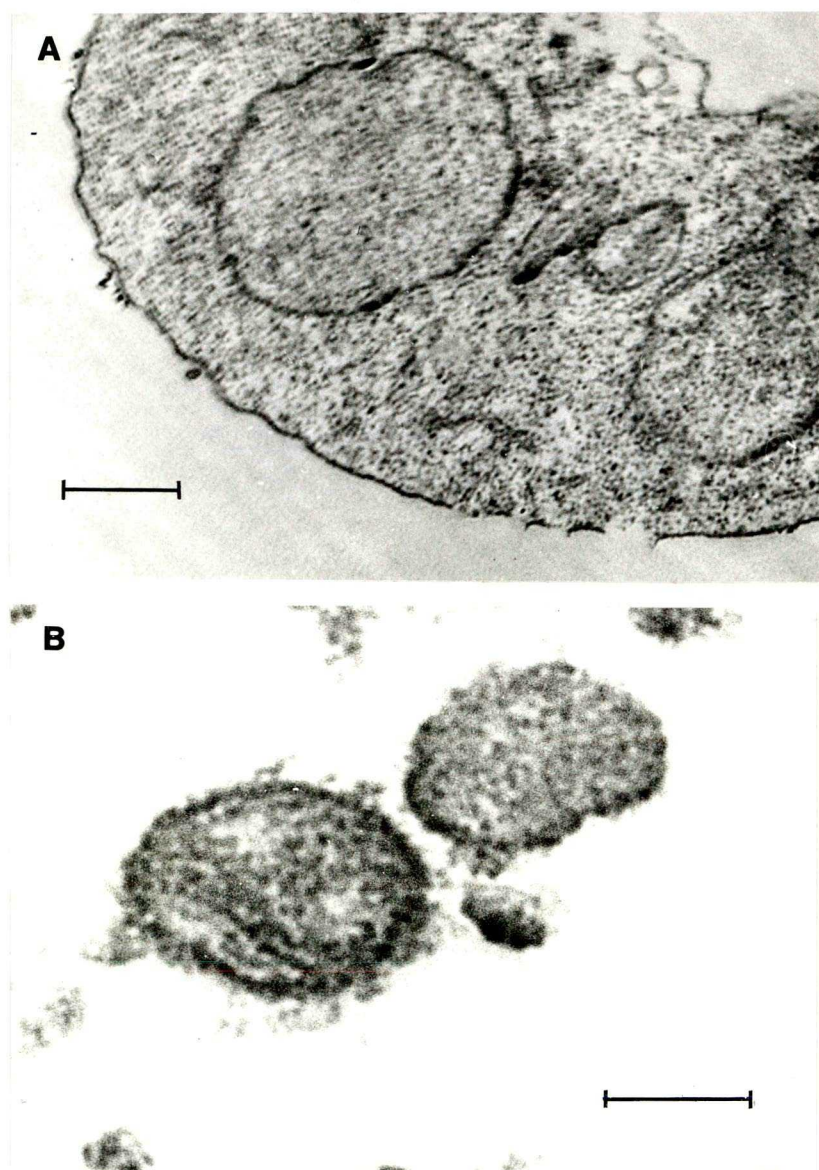
Sejtmagfestésre a DAPI bizonyult a leg-
használhatóbbnak, mivel kevésbé halványult UV fényben,
mint a többi kipróbált festék. Segítségével mind a
sejtfonalakban és a protoplasztokban, mind a
protoplaszt homogenizátumban és a végső magfrakcióban
(3. kép) jól megfigyelhetően festődtek a magok. Az
izolált és az in situ sejtmagok azonos megjelenésűek
voltak. Kerekded, ovális vagy enyhén szabálytalan alakú
testek, kissé változó átmérővel. Jól lehatárolt, fényes
sárga-sárgászöld festődésük lehetővé tette a más
sejtalkotóktól való jó elkülönítésüket, ép vagy sérült
voltuk megállapítását. Ezen fénymikroszkópos
vizsgálatok szerint a sejtmagfrakció lényegében mentes
volt az ép protoplasztok, fonaldarabok és a
citoplazmatikus maradványok okozta szennyeződéstől.

4.3.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok megerősítették
fénymikroszkópos megfigyeléseinket. Az izolált sejtmagok és a protoplasztokban megfigyeltek azonos megjelenésűek voltak (4. kép). A magok átmérője 0,8-1,5 μm közötti volt. Egy részüknél a magmembrán jelenléte is megfigyelhető. Szennyeződésként elsősorban, a feltehetőleg az elektronmikroszkópos mintakészítés során



3. kép: Fluoreszcensen festett sejtmagok hifában (A), protoplasztban (B), protoplaszt homogenizátumban (C) és izolált állapotukban (D). (A feltüntetett méret 10 μm -t jelöl.)



4. kép: SZMC 1157 protoplaszt (A) és izolált sejtmagok
(B) elektronmikroszkópos képe
(A feltüntetett méret 0,5 μm -t jelöl.)

dezintegrálódott magokból származó kromatintöredékek voltak jelen.

4.3.3. Izolált sejtmagok kémiai összetétele

A 5. táblázatban az *A. nidulans* SZMC 1157-ből izolált sejtmagok kémiai analízisének eredménye látható, korábbi sejtmagizolálási eljárásokban kapott értékekkel összevetve.

4.3.4. Enzimológiai vizsgálatok

A G-6-PDH a citoplazma egyik marker enzime. Meghatározva és összevetve a teljes protoplaszt homogenizátum és a Nycodenz grádiensről nyert magfrakció G-6-PDH aktivitását, a magfrakcióban az eredeti aktivitás mindössze átlagosan 1,93%-t találtuk. Ez is jelzi a citoplazma eredetű szennyeződés minimális voltát.

4.3.5. Regenerációs vizsgálatok.

A regenerációs vizsgálatok szerint a magfrakcióban alig van jelen regenerálódni képes protoplaszt illetve hifadarab. Ozmótikusan nem érzékeny sejtes szennyeződés (hifadarab), a protoplasztálás minőségétől függően változó, de általában a regenerálódni képes protoplasztoknál kisebb számban hozott létre telepeket

	DNS	RNS	Fehérje	Megjegyzés
<i>Aspergillus nidulans</i>				
Gealt és mtsi., 1976.	1	2,8	8,7	diploid
Vágvölgyi., 1990.	1	3,0	10,8	haploid
<i>Neurospora crassa</i>				
Dutta, 1969.	1	- 5	-	
Hautala és mtsi., 1977.	1	3,5	7	-
Hsiang és Cole, 1973.	1	6,3	-	-
<i>Physarum polycephalum</i>				
Mohrberg és Rusch, 1971.	1	1	5	-
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>				
Rozijn és Tonino, 1964.	1	3,7	35	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Bhargava és Halvorson, 1971.	1	2,5	15,6	-
Doi és Doi, 1974.	1	2,7	13,7	tetraploid
Kamimura és mtsi., 1981.	1	4	17	haploid
Mann és Mecke, 1980.	1	8,6	43	haploid
	1	7,8	38,7	diploid
Wintersberger és mtsi., 1973.	1	4,2	17,3	diploid
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>				
Duffus 1968.	1	5,8	36,5	-
Duffus 1969.	1	9,4	114,5	-

5. táblázat: Izolált gombasejtmagok kémiai összetétele a DNS tartalomhoz viszonyítva.

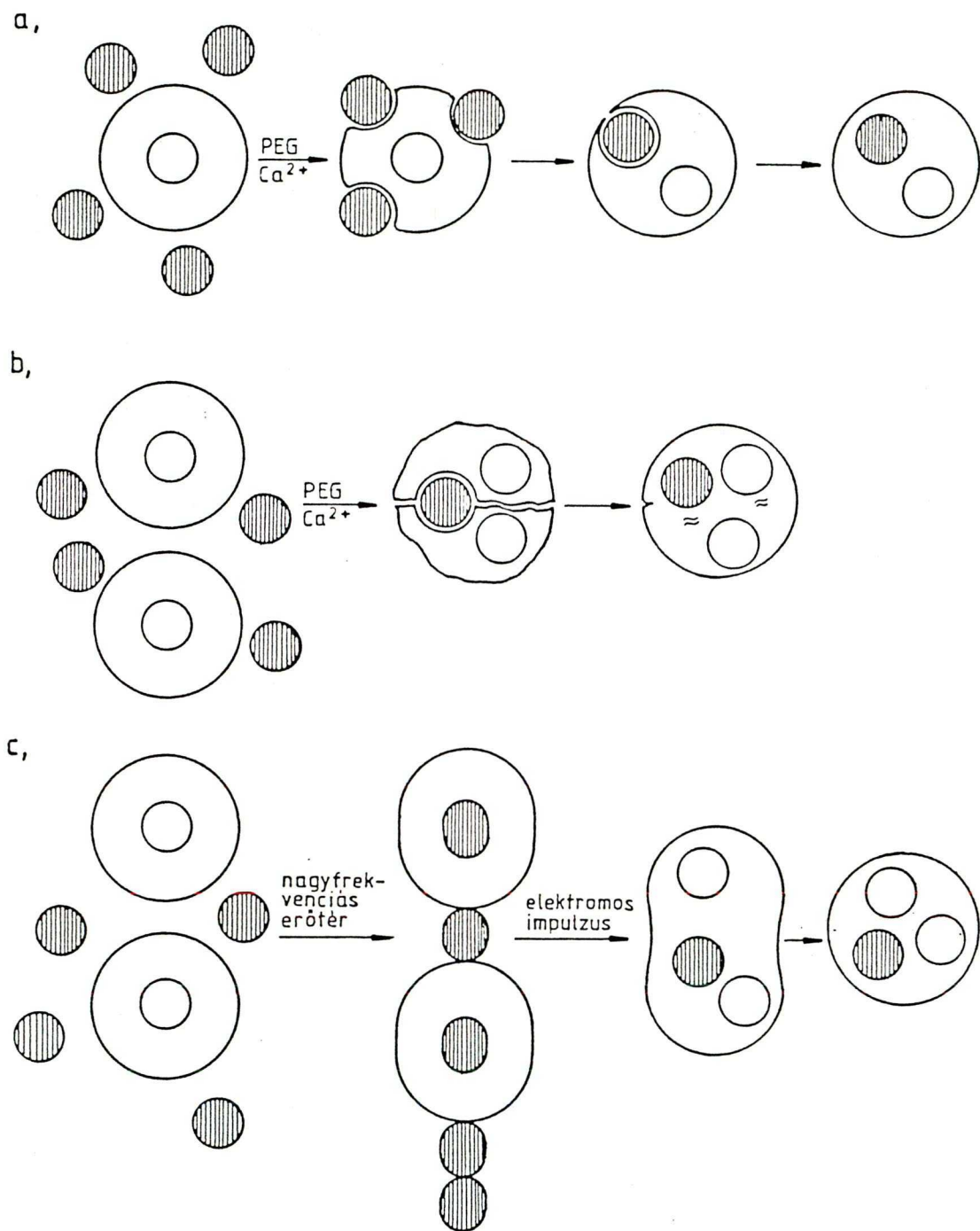
4.4. Sejtmagbeviteli kísérletek eredményei

4.4.1. Durva magpreparátummal folytatott kísérletek

100 %-os protoplaszt pusztulást követően a lehető legrövidebb időn belül kíséreltük meg elérni a sejtmag protoplasztba jutását, hogy minimálisra csökkentsük az enzimatis degradáció lehetőségét (Kokileva, 1979). Bizonyított magbevitelhez nem jutottunk. Ennek valószínű oka a sejtmag károsodása volt a feltáráskor. Feltehető, hogy a detergens és a nisztatin használatakor a magmembrán sérülése, míg hipoozmotikus közegben a magtartalom egy részének elvesztése tette funkcióképtelenné a magokat.

4.4.2. Tisztított sejtmag beviteli kísérletek

Izolált sejtmagok protoplasztba jutásának lehetőségeit mutatja be szematikusan az 5. ábra. PEG- Ca^{2+} fúziós rendszerben csak a **b.** változat eredményezhet magbevitelt, mert az **a.** mechanizmussal - a mag- és a sejtmembrán fúziójakor - a magtartalom mintegy beürül a citoplazmába. A magbevitelből származó hibrid létrejöttének további feltétele, hogy a fuzionáló protoplasztok által körbezárt és így bejutó sejtmag intakt, funkcióképes legyen.



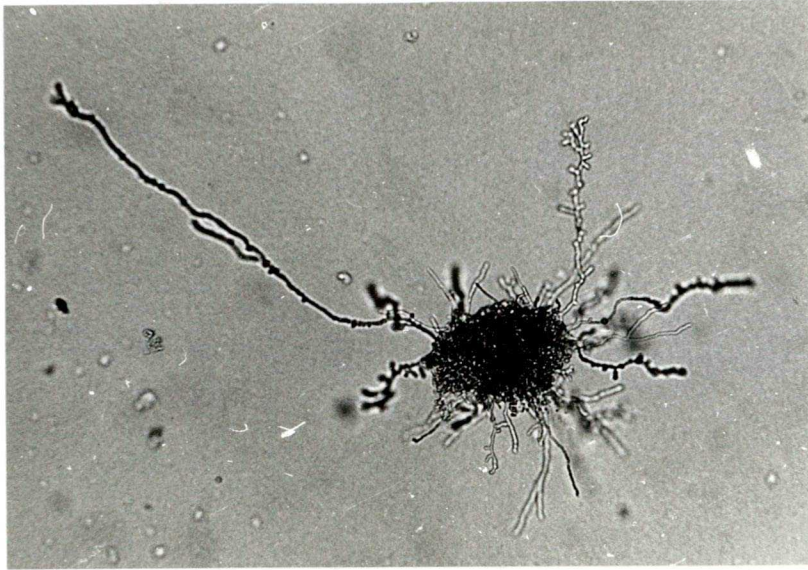
5. ábra: A magbevitel lehetséges mechanizmusai

Az SZMC 1157 izolált sejtmagjainak átvitelét célzó kísérletekben kis gyakorisággal ugyan, de VBM táptalajon is növekedni tudó fúziós termékeket kaptunk (5. kép). Tekintettel arra, hogy mindkét partner auxotróf mutáns, VBM táptalajon növekedni képes telep csak auxotrófia komplementáció révén jöhet létre. Ilyen komplementációt protoplaszt-protoplaszt fúzió vagy és mag protoplasztba jutása eredményezhet. A regenerációs tesztek által az SZMC 1157 magpreparátumában kis számban kimutatható ép, regenerációra (és esetleg fúzióra) képes protoplaszt. A sikeres kísérleteinkben a VBM táptalajon kifejlődő fúziós telepek száma szignifikánsan meghaladta a magpreparátumból kimutatott protoplasztok számát. Ezek a hibridek tehát csak a sejtmag protoplasztba jutása révén jöhettek létre. A beviteli gyakoriság $5 \cdot 10^{-7}$ - 10^8 -on közé esett (6. táblázat).

kísérlet száma	1	2	3
beviteli gyakoriság	$5,0 \cdot 10^{-7}$	$5,3 \cdot 10^{-7}$	$8,1 \cdot 10^{-7}$
bevitellel kapott telepszám	5	6	11

6. táblázat: Három sejtmagbeviteli kísérlet eredménye

Nem vezettek eddig eredményre az elektrofúziós magbeviteli kísérleteink, bár a használt paraméterek hasonlóak voltak, mint amilyenekkel sikeres fúziót



5. kép: Sejtmagbevitelből származó regenerálódó telep
mikroszkópos képe

valósítottak meg *A. nidulans* protoplasztok (Lynch és mtsi., 1989a), illetve *A. nidulans* és *Apium graveolens* (zeller) protoplasztok (Lynch és mtsi., 1989b) között. Ennek ellenére magbevitelből származó hibridet nem kaptunk. Nyilvánvaló, hogy olyan elektrofúziós paraméterek beállítása eredményezhet majd magbevitelt, ahol a *c.* helyett a *b.* mechanizmushoz hasonlóan (5. ábra) protoplaszt-protoplaszt fúzióval jutnak sejten belülrre a magok.

4.5. Fúziós hibridek analízise

A sejtmagbevitelből származó, a fúziós csészéken kinövő hibridek jellegzetes, szabálytalan morfológiájú, kiegyensúlyozatlan növekedésű telepeket fejlesztettek (6. kép). Ezek néhány napos inkubáció után erős konídium képződést mutattak. Hifadarabkát oltva stabilizálatlan VBM táptalajra a kifejlődő telepek szabályosabb növekedésűek lettek. Konídiumaik és telepdarabok leoltásának eredményeit különböző táptalajra a 7. táblázat mutatja.

	Konídium	Telepdarab
VBM - PABA	-	-
VBM	-	+
VBM + adenin	+	+
VBM + lizin	+	+
CM	+	+

7. táblázat: Fúziós telepek leoltásának eredménye különböző táptalajokra.

+ = van növekedés

- = nincs növekedés



6. kép: Heterokariótikus telepek magbeviteles fúziós
csészén

Morfológiai jellemzőik illetve biokémiai sajátosságaik alapján a kifejlődött telepek heterokarionoknak bizonyultak.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során *A. nidulans* sejtmagjainak protoplasztokból történő izolálását, jellemzését és recipiens protoplasztokba történő bevitelét valósítottuk meg.

(a) Meghatároztuk azokat a feltételeket, melyek lehetővé tették a sejtmagizoláláshoz szükséges nagy mennyiségű protoplaszt előállítását folyadék-tenyészetből.

(b) A protoplaszt populáció heterogenitása alapján meghatároztuk, hogy a két törzs közül melyik (az SZMC 1157) alkalmasabb sejtmag izolálására.

(c) Optimalizáltuk a magizolálás során használt oldatok összetételét. Elsősorban az ozmótikum, magmembrán stabilizáló polimerek, kétértékű ionok és a pH hatását vizsgáltuk. Összefoglalva ezen kísérletek eredményeit megállapítható, hogy az *Aspergillus* sejtmag sok tekintetben az élesztő sejtmaghoz hasonlóan viselkedett.

(d) Számos sejtfeltérési eljárásnál vizsgáltuk a protoplaszt feltérás hatékonyságát, összevetve a kiszabaduló sejtmagok állapotával. Kedvezőnek a French press használatát találtuk, mert kevés sérült magot ($\approx 50\%$) eredményezett kis protoplaszt túlélés mellett ($\approx 0,01\%$).

(e) Sejtmagizolálási eljárást dolgoztunk ki - utolsó lépéseként Nycodenz sűrűséggrádiensen történő elválasztást alkalmazva - mely lehetővé tette *A. nidulans* SZMC 1157 törzséből megfelelő magpreparátum készítését. A kiinduláskor jelenlevő sejtmagok átlagosan mintegy 26 %-a nyerhető így ki.

(f) Az izolált sejtmagok állapotát és tisztaságát többféleképpen vizsgáltuk. A fény- és elektronmikroszkópos megfigyelések feltárták, hogy az izolált sejtmagok számottevő szennyeződéstől mentesen, jó állapotban vannak jelen a magfrakcióban. Meghatároztuk az izolált sejtmagokban a DNS:RNS:fehérje arányt is (1:3,0:10,8), továbbá, hogy a G-6-PDH aktivitás hány százaléka marad vissza a magfrakcióban (1,93%). Mindkét eredmény azt mutatja, hogy a sejtmagok mentesek a számottevő citoplazmatikus szennyeződéstől.

(g) Izolált *Aspergillus* sejtmagok felhasználásával különböző sejtmagbeviteli kísérleteket is végeztünk. Az un. durva magpreparátummal folytatott kísérletek nem vezettek eredményre. Hasonlóképpen nem sikerült eddig tisztított sejtmagot elektrofúzióval protoplasztokba juttatnunk. Ugyanakkor kis gyakoriságú ($5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-8}), de reprodukálható bevitelt sikerült megvalósítani PEG- Ca^{2+} indukálta fúzióval. Az így kapott hibridtelepek jellegzetes heterokariótikus tulajdonságokat mutattak.

Eddigi eredményeinkre támaszkodva a jövőben tovább kívánjuk tökéletesíteni a sejtmagizolálást (pl. a feltárás finomításával) továbbá megkíséreljük növelni a magbevitel hatékonyságát (pl. elektrofúzió alaposabb vizsgálatával, a PEG-Ca²⁺ rendszer optimalizálásával).

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Bainbridge, B. W. (1971) Macromolecular composition and nuclear division during spore germination in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 66, 319-325.
- Ballance, D. J., Buxton, F. P., Turner, G. (1983) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 284-289.
- Baum, P., Thorner, J. (1986) Preparation of isolated nuclei from *Saccharomyces cerevisiae*. In Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. F. Sherman, G. R. Fink, J. B. Hicks (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor-New York, pp. 139-141.
- Becher, D., Conrad, B., Böttcher, F. (1982) Genetic transfer mediated by isolated nuclei in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 6, 163-165.
- Belov, A. P., Zinchenko, G. A., Balashova, L. D., Davidova, E. G. (1989) The isolation of *Candida utilis* nuclei and the characteristics of their lipid composition. Mikrobiologija 58, 562-565.
- Bhargava, M. M., Halvorson, H. O. (1971) Isolation of nuclei from yeast. J. Cell Biol. 49, 423-429.
- Boehringer Mannheim GmbH. (1975) Biochemica Information. pp. 99-100.
- Bracker, C. E. (1967) Ultrastructure of fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 5, 343-374.
- Bradbury, E. M., Matthews, H. R. (1981) Structure and function of chromatin. In The Fungal Nucleus. K. Gull, S. G. Oliver (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 159-190.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brooks, R.R., Huang, P.C. (1972) Redundant DNA of *Neurospora crassa*. Biochem. Genet. 6, 41-49.

- Butt, T. M., Hoch, H. C., Staples, R. C., St. Leger, R. J. (1989) Use of fluorochromes in the study of fungal cytology and differentiation. *Exp. Mycol.* 13, 303-320.
- Campbell, A. M., Winder, F. G. (1983) Properties of deoxyribonuclease 4 from *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Biophys. Acta* 746, 125-132.
- Carter, B. L. A. (1978) The yeast nucleus. *Adv. Microbiol. Physiol.* 17, 243-302.
- Caten, C. E. (1981) Parasexual processes in fungi. In *The Fungal Nucleus*. K. Gull, S. G. Oliver (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 191-214.
- Certa, U., Colavito-Shepanski, M., Grunstein, M. (1984) Yeast may not contain H1: the only known "histon H1-like" protein in *Saccharomyces cerevisiae* is a mitochondrial protein. *Nuc. Acid Res.* 12, 7975-7985.
- Charlesworth, M. C., Parish, R. W. (1975) The isolation of nuclei and basic nucleoproteins from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* 54, 307-316.
- Clutterbuck, A. J. (1974) *Aspergillus nidulans*. In *Handbook of Genetics*. R. C. King (ed.). Plenum Press, New York, pp. 447-510.
- Das, A., Gokhale, D. V., Peberdy, J. F. (1989) Protoplast fusion and genetic recombination in intra- and interstrain crossing in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11, 2-5.
- Davies, K. E., Walker, I. O. (1977) In vitro transcription of RNA in nuclei, nucleoli and chromatin from *Physarum polycephalum*. *J. Cell. Sci.* 26, 267-279.
- Davis, B. (1985) Factors Influencing Protoplast Isolation. In *Fungal Protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics*. J. F. Peberdy, L. Ferenczy (eds.). Marcel Dekker Inc., New York-Basel, pp. 45-72.
- Doi, K., Doi, A. (1974) Isolation of nuclei from a tetraploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 75, 1017-1026.

- Duffus, J. H. (1968) The isolation of nuclei from *Schizosaccharomyces pombe*. In Proceedings of the 2nd International Symposium on Yeast Protoplasts. O. Necas, A. Svoboda (eds.). University J. E. Purkyne, Brno, pp. 53-57.
- Duffus, J. H. (1969) The isolation of nuclei from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Biochim. Biophys. Acta 195, 230-233.
- Duffus, J. H. (1975) The isolation of yeast nuclei and methods to study their properties. In Methods in Cell Biology XII. D. M. Prescott (ed.). Academic Press, New York-London, pp. 77-97.
- Dutta, S. K. (1969) The isolation of nuclei from *Neurospora crassa* conidia. Neurospora Newslett. 4, 9.
- Dutta, S. K., Gbadamosi, I., Chambers, C., Mukhopadhyay, D. K. (1980) Comparison of nuclear DNA with whole cell DNA isolated from *Neurospora crassa*. Neurospora Newslett. 27, 18-19.
- Eddy, A. A. (1959) The probable nuclear origin of certain of the bodies released from yeast protoplasts by ultrasonic treatment. Exp. Cell Res. 17, 447-464.
- Eddy, A.A., Williamson, D. H. (1957) A method of isolating protoplasts from yeasts. Nature 179, 1252-1253.
- Elliott, C. G. (1960) The cytology of *Aspergillus nidulans*. Genet. Res. Camb. 1, 462-476.
- Emerson, S. (1963) Slime. A plasmodioid variant of *Neurospora crassa*. Genetica 34, 162-182.
- Felden, R. A., Sanders, M. M., Morris, N. R. (1976) Presence of histones in *Aspergillus nidulans*. J. Cell Biol. 68, 430-439.
- Ferenczy, L. (1984) Fungal protoplast fusion: Basic and applied aspects. In Cell Fusion: Gene Transfer and Transformation. R. F. Beers, E. G. Bassett (eds.). Raven Press, New York, pp. 145-169.
- Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M. (1975) Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. Experientia 31, 50-52.
- Ferenczy, L., Kevei, F., Zsolt, J. (1974) Fusion of fungal protoplasts. Nature 248, 793-794.

- Ferenczy, L., Pesti, M. (1982) Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* 7, 157-160.
- Franke, W. W. (1974) Structure biochemistry and functions of the nuclear envelope. *Int. Rev. Cytol. Supp.* 4, 71-236.
- Franke, W. W., Scheer, U., Krohne, G., Jarasch, E. D. (1981) The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J. Cell Biol.* 91, 39s-50s.
- Gealt, M. A., Sheir-Neiss, G., Morris, N. R. (1976) The isolation of nuclei from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 94, 204-210.
- Gilboa, E., Soreq, H., Aviv, H. (1977) Initiation of RNA synthesis in isolated nuclei. *Eur. J. Biochem.* 77, 393-400.
- Giles, K. W., Myers, A. (1965) An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 206, 93.
- Griffin, D. H. (1981) *Fungal Physiology*. John Wiley & Sons, New York.
- Groner, B., Phillips, S. L. (1975) Polyadenylate metabolism in the nuclei and cytoplasm of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 250, 5640-5646.
- Gross, D. S., Szent-Gyorgyi, C., Garrard, W. T. (1986) Yeast as a model system to dissect the relationship between chromatin structure and gene expression. In *Yeast Cell Biology*. J. Hicks (ed.). Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 345-366.
- Gull, K. (1981) Microtubules and microtubule proteins in fungi. In *The Fungal Nucleus*. K. Gull, S. G. Oliver (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 113-132.
- Gull, K., Oliver, S. G. (eds.) (1981) *The fungal nucleus*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gull, K., Trinci, A. P. J. (1974) Detection of areas of wall differentiation in fungi using fluorescent staining. *Arch. Microbiol.* 96, 53-57.

- Gulløv, K. B., Friis, J. (1978) Isolation of chromatin from *Saccharomyces cerevisiae*: The metabolic state in relation to the protein content of chromatin and its susceptibility to micrococcal nuclease. *Exp. Mycol.* 2, 161-172.
- Gulløv, K., Friis, J. (1980) Chromosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. I. *Curr. Genet.* 2, 69-74.
- Gulløv, K., Friis, J. (1980) Chromosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. II. *Curr. Genet.* 2, 75-78.
- Hautala, J. A., Conner, B. H., Jacobson, J. W., Patel, G. L., Giles, N. H. (1977) Isolation and characterization of nuclei from *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 130, 289-296.
- Hautala, J. A., Giles, N. H. (1977) Technical notes on the isolation of *Neurospora* nuclei. *Neurospora Newslett.* 24, 16.
- Heath, I. B. (1980) Fungal mitosis, the significance of variations on the theme. *Mycologia* 72, 229-250.
- Heath, I. B. (ed.) (1978) *Nuclear Division in Fungi*. Academic Press, New York.
- Herbert, D., Phipps, P. J., Strange, R. E. (1971) Determination of nucleic acids. In *Methods in Microbiology* 5B. J. R. Norris, D. W. Ribbons (eds.). Academic Press, London, pp. 209-344.
- Horgen, P. A., Silver, J. C. (1978) Chromatin in eukaryotic microbes. *Ann. Rev. Microbiol.* 32, 249-284.
- Hsiang, M. W., Cole, R. D. (1973) The isolation of histone from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 248, 2007-2013.
- Ide, G. J. (1981) Nucleoside 5'-[γ -S]triphosphates will initiate transcription in isolated yeast nuclei. *Biochemistry* 20, 2633-2638.
- Ide, G. J., Saunders, C. A. (1981) Rapid isolation of yeast nuclei. *Curr. Genet.* 4, 85-90.
- Jaworski, A. J., Horgen, P. A. (1973) The ribosomal cistrons of the water mold *Achlya bisexualis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 260-267.

- Jerome, J. F., Jaehning, J. A. (1986). mRNA transcription in nuclei isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1633-1639.
- Jockusch, B. M., Walker, I. O. (1974) The preparation and preliminary characterisation of chromatin from the slime mould *Physarum polycephalum*. *Eur. J. Biochem.* 48, 417-425.
- Jordan, E. G., Severs, N. J., Williamson, D.H. (1977) Nuclear pore formation and the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell. Res.* 104, 446-449.
- Kamimura, K., Tsuchiya, E., Miyakawa, T., Fuki, S., Hirata, A. (1981) Isolation and characterization of the nuclei from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* 6, 175-180.
- Kangatharalingam, N., Ferguson, M. W. (1984) A simple and rapid technique for fluorescence staining of fungal nuclei. *Curr. Microbiol.* 10, 99-104.
- Kempers-Veenstra, A. Musters, W., Dekker, A., Klootwijk, J., Planta, R. (1985) Deletion mapping of the yeast Pol I promoter. *Curr. Genet.* 10, 253-260.
- Kevei, F., Peberdy, J. F. (1979) Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 170, 213-218.
- Kevei, F., Peberdy, J. F. (1984) Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridisation within the *Aspergillus nidulans* groups. *J. Gen. Microbiol.* 130, 2229-2236.
- Kloet, S. R., Beltz, W. R. (1975) Control of the formation of ribonucleic acid in a nuclear fraction of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 322-334.
- Koa, H., Fraser, M. J., Käfer, E. (1990) Endo-exonuclease of *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Cell Biol.* 68, 387-392.
- Kokileva, L. B. (1979) DNA degradation in isolated rat liver nuclei. *Molec. Biol. Rep.* 5, 171-174.

- Kondorosi, É., Duda, E., (1980) Introduction of foreign genetic material into cultured mammalian cells by liposomes loaded with isolated nuclei. FEBS Letters 120, 37-40.
- Krumlauf, R., Marzluf, G. A. (1978) A convenient method for the isolation of crude nuclear pellets. Neurospora Newslett. 25, 15-16.
- Lohr, D. (1988) Isolation of yeast nuclei and chromatin for studies of transcription-related processes. In Yeast: a practical approach. I. Campbell, J. H. Duffus (eds.). IRL Press, Oxford-Washington D.C., pp. 125-145.
- Lohr, D., Ide, G. (1979) Comparison of the structure and transcriptional capability of growing phase and stationary yeast chromatin: a model for reversible gene activation. Nucl. Acids Res. 6, 1909-1927.
- Lohr, D., Kovacic, R. T., Van Holde, K. E. (1977) Quantitative analysis of the digestion of yeast chromatin by staphylococcal nuclease. Biochemistry 16, 463-471.
- Lohr, D., Van Holde, K. E. (1975) Yeast chromatin subunit structure. Science 188, 165-166.
- Lörz, H., Potrykus, I. (1978) Investigations on the transfer of isolated nuclei into plant protoplasts. Theor. Appl. Genet. 53, 251-256.
- Lynch, P. T., Isaac, S., Collin, H. A. (1989) Electrofusion of protoplasts from *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. 59, 225-228.
- Lynch, P. T., Isaac, S., Collin, H. A. (1989) Electrofusion of protoplasts from celery (*Apium graveolens* L.) with protoplasts from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Planta 178, 207-214.
- Maemura, T., Yamashita, I., Fukui, S. (1983) Karyoduction in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 158, 50-52.
- Mann, K., Mecke, D. (1980) Isolation and characterization of nuclei and nuclear membranes from *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. FEBS Lett. 122, 95-99.
- Martegani, E., Trezzi, F. (1979) Fluorescent staining of *Neurospora* nuclei with DAPI. Neurospora Newsl. 26, 20-21.

- May, R. (1971) Isolationsbedingungen für Zellkerne aus Hefeprotoplasten. Z. Allg. Mikrobiol. 11, 131-142.
- Mittermayer, C., Braun, R., Rusch, H. P. (1966) Ribonucleic acid synthesis in vitro in nuclei isolated from the synchronously dividing *Physarum polycephalum*. Biochim. Biophys. Acta 114, 536-546.
- Mohberg, J., Rusch, H. P. (1971) Isolation and DNA content of nuclei of *Physarum polycephalum*. Exp. Cell Res. 66, 305-316.
- Molenaar, I., Sillevis Smitt, W. W., Rozijn, TH. H., Tonino, G. J. M. (1970) Biochemical and electron microscopic study of isolated yeast nuclei. Exp. Cell. Res. 60, 148-156.
- Morris, N. R. (1976) Nucleosome structure in *Aspergillus nidulans*. Cell 8, 357-363.
- Morris, N. R., Felden, R. A., Gealt, M. A., Nardi, R. V., Sheir-Neiss, G., Sanders, M. M. (1977) The *Aspergillus* nucleus: Histones, chromatin and tubulin. In Genetics and Physiology of *Aspergillus*. J. E. Smiths, J. A. Pateman (eds.). Academic Press, London-New York, pp. 267-279.
- Munkres, K. D., Munkres, M. N., Greene, P., Hedman, S., Andrews, B. J., Holland, G., Woodward, D. O. (1966) Isolation of subcellular fractions of *Neurospora mycelia*. Neurospora Newsl. 9, 14-15.
- Nelson, D. A., Beltz, W. R., Rill, R. L. (1977) Chromatin subunits from baker's yeast: Isolation and partial characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1343-1347.
- Peberdy, J. F. (1985) Mycolytic enzymes. In Fungal Protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics. J. F. Peberdy, L. Ferenczy (eds.). Marcel Dekker Inc., New York-Basel, pp. 31-44.
- Peberdy, J. F. (1989) Fungi without coats - protoplasts as tools for mycological research. Mycol. Res. 93, 1-20.
- Peberdy, J. F., Ferenczy, L. (eds.) (1985) Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics. Marcel Dekker Inc., New York-Basel.

- Peterson, J. B., Ris, H. (1976) Electron-microscopic study of the spindle and chromosomal movement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Sci. 22, 219-242.
- Podila, G. K., Dickman, M. B., Kolattukudy, P. E. (1988) Transcriptional activation of a cutinase gene in isolated fungal nuclei by plant cutin monomers. Science 242, 922-925.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, D. W., Macdonald, K. D., Bufton, A. W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5, 141-238.
- Raju, N. B. (1986) A simple fluorescent staining method for meiotic chromosomes of *Neurospora*. Mycologia 78, 901-906.
- Ramón, D., Ferrer, S., Pérez-Ortín, J. E. (1987) Presence of nucleosomes in *Penicillium chrysogenum*. Curr. Microbiol. 15, 151-154.
- Raper, K. B., Fennel, D. I. (1965) The Genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Reich, E., Tsuda, S. (1961) Isolation of nuclei of *Neurospora crassa*. Biochim. Biophys. Acta 53, 574-575.
- Rickwood, D. (ed.) (1983) Iodinated density gradient media. IRL Press, Oxford-Washington DC.
- Robinow, C. F., Marak, J. (1966) A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. J. Cell Biol. 29, 129-151.
- Rozijn, Th. H., Tonino, G. J. M. (1964) Studies on the yeast nucleus. I. The isolation of nuclei. Biochim. Biophys. Acta 91, 105-112.
- Sajdel-Sulkowska, E. M., Bhargava, M. M., Arnaud, M. V., Halvorson, H. O. (1974) An improved method for the isolation of yeast nuclei active in RNA synthesis in vitro. Biochem. Biophys. Res. Com. 56, 496-502.
- Saxena, P. K., Mii, M., Crosby, W. L., Fowke, L. C., King, J. (1986) Transplantation of isolated nuclei into plant protoplasts. Planta 168, 29-35.
- Schatten, G., Thoman, M. (1978) Nuclear surface complex as observed with the high resolution scanning electronmicroscope. J. Cell Biol. 77, 517-535.

- Schneider, W. C. (1957) Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In *Methods in Enzymology III*. S. P. Colowick, N. O. Kaplan (eds.). Academic Press, New York, pp. 680-684.
- Schultz, L. D. (1978) Transcriptional role of yeast deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase III. *Biochemistry* 17, 750-758.
- Severs, N. J., Jordan, E. G. (1978) Nuclear pores. Can they expand and contract to regulate nucleocytoplasmic exchange? *Experientia* 34, 1007-1011.
- Sillevis Smitt, W. W., Vlak, J. M., Molenaar, I., Rozijn, Th. H. (1973) Nucleolar function of the dense crescent in the yeast nucleus. *Exp. Cell Res.* 80, 313-321.
- Singleton, J. R. (1953) Chromosome morphology and the chromosome cycle in the ascus of *Neurospora crassa*. *Amer. J. Botany* 40, 124-144.
- Slater, M. L. (1976) Rapid nuclear staining method for *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 126, 1339-1341.
- Sukoyan, M. A., Belyaev, N. D., Budker, V. G., Gradov, A. A., Pack, S. D., Serov, O. L. (1985) Transfer of mink genes into mouse cells by means of isolated lipid-encapsulated nuclei. *Mol. Gen. Genet.* 201, 487-491.
- Szegedi, M. (1976) *Aspergillus* fajok protoplasztjainak intra- és interspecifikus fúziója. JATE Mikrobiológiai Tanszék, Doktori értekezés.
- Szent-Gyorgyi, C., Isenberg, I. (1983) The organization of oligonucleosomes in yeast. *Nuc. Acids Res.* 11, 3717-3736.
- Talbot, K., Russell, P. J. (1980) Nuclear density determination and the purification of wild type *Neurospora* nuclei using Percoll gradients. *Neurospora Newslett.* 27, 32-33.
- Tekamp, P. A., Valenzuela, P., Maynard, T., Bell, G. I., Rutter, W. J. (1979) Specific gene transcription in yeast nuclei and chromatin by added homologous RNA polymerases I and III. *J. Biol. Chem.* 254, 955-963.
- Timberlake, W. E. (1978) Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. *Science* 202, 973-975.

- Timberlake, W. E., Marshall, M. A: (1988) Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. Trends Genet. 4, 162-169.
- Tsuchiya, E., Shakuto, S., Tokichi, M., Fukui, S. (1988) Characterization of a DNA uptake reaction through the nuclear membrane of isolated yeast nuclei. J. Bacteriol. 170, 547-551.
- Umesono, K., Hiraoka, Y., Toda, T., Yanagida, M. (1983) Visualization of chromosomes in mitotically arrested cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Curr. Genet. 7, 123-128.
- Unwin, P. N. T., Milligan, R. A. (1982) A large particle associated with the perimeter of the nuclear pore complex. J. Cell Biol. 93, 63-75.
- Vágvölgyi, Cs., Brückner, B., Frankó, A. (1990) Size-dependent regeneration of *Gibberella* protoplasts. Acta Microbiol. Hung. (közlésre benyújtva)
- Vágvölgyi, Cs., Kucsera, J., Ferenczy, L. (1988) A physical method for separating *Saccharomyces cerevisiae* cells according to their ploidy. Can. J. Microbiol. 34, 1102-1104.
- van den Broek, H. W. J., Stunnenberg, H. G., Wennekes, L. M. J. (1979) Protoplasts from *Aspergillus nidulans*. Microbios 26, 115-128.
- Westergaard, M., von Wettstein, D. (1970) Studies on the mechanism of crossing over. IV. The molecular organization of the synaptonemal complex in *Neotiella*. Compt. Rend. Lab. Carlsberg. 37, 239-268.
- Wickerham, L. J. (1951) Taxonomy of yeasts. U. S. Dept. Agriculture Technical Bulletin No. 1029.
- Wills, J. W., Lasker, B. A., Sirotkin, K., Riggsby, W. S. (1984) Repetitive DNA of *Candida albicans*: Nuclear and mitochondrial components. J. Bacteriol. 157, 918-924.
- Wintersberger, U., Smith, P., Letnansky, K. (1973) Yeast chromatin. Preparation from isolated nuclei, histone composition and transcription capacity. Eur. J. Biochem. 33, 123-130.

Zickler, D. (1977) Development of the synaptonemal complex and the "recombination nodules" during meiotic prophase in the seven bivalents of the fungus *Sordaria macrospora* Auersw. Chromosoma, 61, 289-316.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Ferenczy Lajos tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy doktori értekezésem elkészítését lehetővé tette, értékes elméleti és gyakorlati tanácsaival messzemenően támogatta.

Köszönetet mondok Dr. Rojik Imrének az elektronmikroszkópos felvételek elkészítéséhez nyújtott segítségért. Hasonlóképpen köszönöm a gondos munkát Dobrovichné Ágoston Évának és Petrina Erzsébetnek a kísérletek elvégzésénél, valamint Nagy Lajos Gergelynek a dolgozat fotóanyagának elkészítésénél.