

József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

Phaffia rhodozyma extrakromoszómális genetikai elemei

Doktori (PhD) Értekezés

Készítette: Pfeiffer Ilona
Témavezetők: Dr. Ferenczy Lajos
egyetemi tanár
Dr. Avasiné Dr. Kucsera Judit
adjunktus
Készült: JATE Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

1996

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Ábrák jegyzéke	5
1 Bevezetés	7
2 Tudományos háttér	9
2.1 Extrakromoszómális elemek gombákban	9
2.1.1 A mitokondriális DNS	9
2.1.2 Lineáris DNS plazmidok	13
2.1.3 Gomba vírusok és vírusszerű partikulumok (VLP)	16
2.2 A <i>Phaffia rhodozyma</i> jellemzése	21
3 Felhasznált mikroorganizmusok és anyagok	25
3.1 Mikroorganizmusok	25
3.2 Táptalajok, tápoldatok	25
3.3 Oldatok, pufferek	28
3.4 Festékek, reagensek	30
3.5 Felhasznált enzimek	31
3.6 Felhasznált génpróbák	32

4 Felhasznált módszerek	33
4.1 Protoplasztképzés	33
4.2 Mitokondriumok izolálása	33
4.3 Az oxigénfogyasztás mérése	33
4.4 Citokróom c-oxidáz teszt	33
4.5 DNS elválasztás CsCl gradiensen	34
4.6 Totál DNS izolálás	34
4.7 DNS blottolás és hibridizáció	34
4.8 DNS fragmentek klónoozása, baktérium transzformáció	35
4.9 Plazmid tisztítás	35
4.10 DNS szekvencia meghatározása	35
4.11 Minilizátum készítése élesztőgombasejtekből	35
4.12 Nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel	36
4.13 Víruspartikulumok izolálása	36
4.14 Elektronmikroszkópia	36
4.15 VLP-k elválasztása gélelektroforézissel	37
4.16 A törzsek killer aktivitásának vizsgálata	37
4.17 A vírus átvitel vizsgálata	37
4.18 A kromoszómális DNS elválasztása	38

4.19	A vírusok vegetatív reprodukcióra gyakorolt hatása	38
4.20	A vírusok ivaros szaporodásra gyakorolt hatása	38
5	Eredmények, értékelés	39
5.1	Petite mutánsok izolálása	39
5.2	Petite mutáció indukálása	39
5.3	A mitokondriumok működésének vizsgálata	41
5.3.1	Citokróom-oxidáz próba	41
5.3.2	Az O ₂ fogyasztás mérése	41
5.4	A mitokondriális DNS jellemzése	43
5.4.1	mtDNS izolálás	43
5.4.2	A mtDNS felépítésének vizsgálata	44
5.4.3	Mitokondriális gének azonosítása	44
5.4.4	DNS szekvencia meghatározása	46
5.5	dsRNS vírusok és DNS plazmidok	46
5.6	A dsRNS mintázat	47
5.7	Vírusszerű partikulumok izolálása és jellemzése	47
5.8	Mutagén kezelés hatása a dsRNS molekulákra	51
5.9	A dsRNS vírusok gazdaszervezetre gyakorolt hatásának vizsgálata . .	51
5.9.1	A vírusok hatása a vegetatív reprodukcióra	51

5.9.2	A vírusok hatása az ivaros szaporodásra	53
5.9.3	Killer aktivitás vizsgálata	54
5.10	A dsRNS-ek transzmissziója	54
5.11	A DNS plazmidok vizsgálata	56
5.12	Mutagén kezelés hatása a DNS plazmidokra	56
5.13	A DNS plazmidok sejten belüli elhelyezkedése	57
5.14	Szekvencia homológia vizsgálat	58
6	Összefoglalás	60
7	Irodalomjegyzék	63
8	Közlemények jegyzéke	76
	Köszönetnyilvánítás	79

Ábrák jegyzéke

1	<i>P. rhodozyma</i> CBS 5905 törzse 2xYPD és 0,05xYPEtOH táptalajon tenyésztve	39
2	A sejtszám változása az etidium-bromid koncentráció függvényében .	40
3	A petite telepek számának változása a kezelési idő függvényében . . .	40
4	Citokróm c-oxidáz aktivitás	42
5	A CBS 5905 törzs és 1/1 jelzésű spontán petite izolátumának O ₂ fogyasztása	42
6	A CBS 5905 törzs és 1/1 jelzésű spontán petite izolátumának CsCl gradiensen izolált DNS-e	43
7	A CBS 5905 törzs intakt mtDNS-ének <i>Bal31</i> emésztett képe	44
8	A CBS 5905 törzs mtDNS-ének RFLP mintázata	45
9	Hibridizáció <i>Candida parapsilosis</i> 6-os klónjával	45
10	A 0,6 kb <i>Xba</i> I fragment DNS szekvenciájából lefordított aminosav szekvencia összehasonlítása más fajok citokróm c-oxidázainak aminosav szekvenciáival	47
11	<i>P. rhodozyma</i> törzsek minilizátumainak gélelektroforézissel elválasztott képe	48
12	<i>P. rhodozyma</i> törzsek dsRNS mintázata	49
13	Az ATCC 24203 törzs VLP-inek elektronmikroszkópos képe	49

14	Az ATCC 24203 törzs VLP-inek agaróz gélelektroforézissel elválasztott képe	50
15	Az ATCC 24203 törzs VLP-iből izolált dsRNS-k gélelektroforetikus képe	50
16.a	CBS 6938 <i>leu</i> ⁻ , <i>vir</i> ⁻ ; CBS 6938 <i>leu</i> ⁻ , <i>vir</i> ⁺ törzsek kromoszóma mintázata; <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972 <i>h</i> ⁻	52
16.b	CBS 6938 <i>leu</i> ⁻ , <i>vir</i> ⁻ ; ATCC 24203 <i>lys</i> ⁻ , <i>yellow</i> ; CBS 6938 <i>leu</i> ⁻ , <i>vir</i> ⁺ ; törzsek plazmid mintázata; <i>Hind</i> III-emésztett λ DNS	52
17	A CBS 6938 <i>leu</i> ⁻ , <i>vir</i> ⁻ és <i>vir</i> ⁺ törzsének növekedési görbéje	53
18	A CBS 6938 <i>leu</i> ⁻ , <i>vir</i> ⁻ és <i>vir</i> ⁺ törzsének konjugációs gyakorisága, sporulációs intenzitása és rekombinációs gyakorisága	54
19	Killer aktivitás vizsgálata	55
20	A dsRNS-ek transzmissziója	55
21	<i>P. rhodozyma</i> törzsek minilizátumainak gélelektroforetikus képe etidium-bromid kezelés után	56
22	Az ATCC 24229 törzs DNS plazmid mintázatának változása etidium-bromid gátló hatásának megszüntetése után	57
23	Szekvencia homológia a <i>P. rhodozyma</i> plazmidok között	58

1 Bevezetés

A gombák extrakromoszómális genetikai elemeit három csoportba soroljuk. Az első és legfontosabb csoport a *mitokondriális DNS* (mtDNS). Szerkezetéről, a sejtek életében játszott szerepéről napjainkra sok adat halmozódott fel, elsősorban az aszkomicéta gombák köréből. Bár felépítésében és méretében változatos, mégis az általa kódolt gének konzervativitásának következtében filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára alkalmas.

A második csoportot a *DNS plazmidok* alkotják. Mind cirkuláris, mind lineáris felépítésű alakjaik széles körben elterjedtek gombákban. Eredetükről, funkciójukról mindmáig keveset tudunk. Egy részük bizonyítottan a mitokondriális DNS degradációjának terméke, mások funkciójukat vesztett virális elemek leszármazottai lehetnek. Fonális gombákban egy csoportjuk részt vesz a gazdasejt öregedési folyamatainak beindításában. Élesztő gombákban egyes képviselőik speciális toxinokat termelnek. A lineáris felépítésű formáknak az eukarióta sejtek, illetve mitokondriumaik transzformációjában hordozó vektorként való felhasználása napjainkban is kutatás tárgya.

A harmadik csoportba a gombák *vírusai* tartoznak. Túlnyomó többségük ismeretlen funkciójú, a sejtek citoplazmájában elhelyezkedő, fehérje kapsziddal burkolt dsRNS. Vizsgálatuk elsősorban evolúciós jelentőségű. Biogeográfiai mintázataik alapján a különböző törzsek közötti rokoni kapcsolatokra vagy földrajzi izoláltságra következtethetünk. Ismert funkciójú formáik gazdasági jelentőséggel rendelkeznek, mint például a *Saccharomyces cerevisiae* killer toxint termelő dsRNS vírusai, amelyet az élelmiszeriparban alkalmaznak, vagy a szelíd gesztenye kórokozójának a *Cryphonectria parasitica*-nak dsRNS vírusai, melyek a patogén törzsek csökkent virulenciáját okozzák.

A *Phaffia rhodozyma* extrakromoszómális genetikai elemeinek jellemzésével a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- Milyen a felépítése a *P. rhodozyma* mitokondriális DNS-ének, milyen fehérjéket kódol?
- Az általunk izolált petite fenotípusú telepek valódi petite mutánsoknak tekinthetők-e, vagyis kialakulásuk kapcsolatban van-e a mitokondriumok rendellenes működésével?
- Az egyes törzsekben található dsRNS molekulák vírusszerű partikulumok genomját alkotják-e? Mi a sejtek életében betöltött szerepük? Milyen úton valósulhat meg a terjedésük?
- Tartalmaznak-e a törzsek DNS plazmidokat? Ha igen, hol helyezkednek el a sejten belül? Van-e, és ha igen, mi a funkciójuk? Mutatnak-e hasonlóságot más gomba plazmidokkal?

2 Tudományos háttér

2.1 Extrakromoszómális elemek gombákban

2.1.1 A mitokondriális DNS

A mitokondriális DNS felépítése, funkciója

A mitokondriumok szemiautonóm sejtorganellumok, saját genetikai és fehérjeszintetizáló rendszerrel rendelkeznek, ugyanakkor biogenezisük és működésük jelentős sejtmagi szabályozás alatt áll. Eredetükre vonatkozó, napjainkban legelfogadottabb „endoszimbionta elmélet” szerint (Gray, 1989) a mitokondriumok primitív eukarióta sejttel szimbiózist alkotó baktériumoktól származnak. Közös evolúciójuk során az így kialakult organellumból intenzív génáramlás indult meg a sejtmagba (Saccone, 1994). Ez a folyamat fajonként változó méretű, redukált, de minden szervezetben hasonló információ tartalommal rendelkező mitokondriális genomot eredményezett.

A mitokondriális genetika alapjainak lerakása Ephrussi és munkatársai nevéhez fűződik (Ephrussi és mtsai, 1949). Laboratóriumukban olyan légzés deficiens mutánsokat (petite mutánsok) izoláltak, amelyek nem-mendeli öröklésmenetet mutattak. Ezeket a mutációkat egy citoplazmás ρ faktor jelenlétéhez kötötték. A jelenség tényleges magyarázata csak később, a mitokondriális DNS felfedezésével (Schatz és mtsai, 1964), vált lehetővé.

A gombák mitokondriális DNS-e méretével (a jelenleg ismert legkisebb a *Toxulopsis glabrata* 18,9 kb, míg a legnagyobb az *Agaricus bisporus* 176 kb nagyságú mtDNS-e) az állatok és a növények között helyezkedik el. Az eltérő genom nagyság ellenére közel azonos génkészletet találunk minden mtDNS-en, ebből következően a kódoló régiók a genom kisebb hányadát teszik ki a nagyobb mtDNS-sel rendelkező fajok esetében. Ez egyben azt is jelenti, hogy a gombák mtDNS-e nem olyan kom-

pakt felépítésű, mint az állati — ahol a nem kódoló régiók nagysága mindössze 1–2 kb —, de nem is olyan laza szerveződésű, mint a növényi mtDNS, ahol a genom nagy részét nem kódoló szekvenciák alkotják. A géneket hosszabb-rövidebb AT-gazdag intergénikus szakaszok választják el egymástól. Az intergénikus szakaszokon belül néhány faj esetében GC-gazdag szakaszok találhatóak, melyeknek szerepe lehet a fajspecifikus genom átrendeződésben. Itt helyezkednek el továbbá a replikációs origók (ori/rep szekvenciák) is.

A gombák mtDNS-e több, igen konzervatív promóter szekvenciát tartalmaz. A képződött transzkriptumok kettő vagy több kódoló szekvenciát hordoznak (Tracy és Stern, 1995). A géneken belül számos intront azonosítottak. Főleg I. típusú intronok fordulnak elő nagyobb számban, de a *Podospora anserina* és a *Saccharomyces cerevisiae* mtDNS-én II. típusú intronokat is találtak (Lambowitz és Belfort, 1993) (magasabbrendű növényeknél csak II. típusú intronok fordulnak elő, míg az állatokban nincs intron). Az a nagy méretbeli különbség, amely az egyes gomba nemzetségeken belül is megnyilvánul (pl. a *Saccharomyces* nemzetség fajai közül a *S. exiguus* mtDNS-e mindössze 23,7 kb, míg a *S. cerevisiae*-é 68–85 kb) az intronok eltérő számára és különböző hosszúságú intergénikus szakaszok jelenlétére vezethető vissza. Fonális gombákban valószínűleg az előző, míg élesztő gombákban az utóbbi felelős a méretbeli különbségekért (Clark-Walker, 1992).

Egészen a közelmúltig általánosan elfogadott volt az a nézet, hogy a gombák mtDNS-e néhány kivételtől eltekintve cirkuláris felépítésű. Ez a téves elképzelés valószínűleg abból adódott, hogy a legtöbb ismert állati mtDNS cirkulárisnak bizonyult és a restriktív enzim analízis is ezt látszott alátámasztani. A legújabb eredmények azonban azt bizonyítják, hogy a lineáris felépítési forma igen elterjedt (Bendich, 1990; Martin, 1995), különösen az élesztő gombák körében (Fukuhara és Mtsai, 1993). A lineáris mtDNS molekulák vége vagy zárt, „hairpin loop” szerkezetű

(Dinouël és mtsai, 1993), vagy nyílt, tandem elrendeződésű „terminal inverted repeat” (TIR) szekvenciákkal (Nosek és mtsai, 1995). Replikációjuk valószínűleg cirkuláris átmeneti formákon keresztül valósul meg, amely indokolhatja az elektronmikroszkópban észlelhető cirkuláris formákat.

A mitokondriális fehérjék 95%-a a magi DNS-en, 5%-a a mtDNS-en kódolt (Lloyd, 1974). A mtDNS-en található a mitokondriális riboszómák felépítésében résztvevő nagy (LrRNS) és kis (SrRNS) riboszómális RNS génje. Ezek az rRNS molekulák nagyfokú homológiát mutatnak az *Escherichia coli* rRNS-ével, alátámasztva ezáltal a mitokondriumok eubakteriális eredetére vonatkozó elméletet. Élesztő gombákban a mtDNS-en található a *var1* gén, ami a kis riboszóma alegység egy fehérjéjét kódolja. Ezzel biokémiaailag rokon az *S-5* fehérje, ami a *Neurospora* LrRNS génjének egy intronján kódolt. A mtDNS kódolja továbbá a 9S RNS-t, ami az *E. coli* RNáz P-jével analóg enzim RNS komponense, valamint a mitokondriális fehérjeszintézisben résztvevő tRNS-eket. A mitokondrium működésében, az elektrontranszport láncban és az oxidatív foszforilációban résztvevő fehérjék közül a mtDNS-en kódolt a citokróm c-oxidáz 1, 2 és 3 alegysége, a citokróm b, az ATP-áz 6, 8 és 9 alegysége valamint a NADH-dehidrogenáz alegységei (Grossman és Hudspeth, 1985). A *Saccharomyces* és a *Schizosaccharomyces* nemzetség tagjainak mtDNS-én nem található meg a NADH-dehidrogenáz 7 alegységét kódoló gének egyike sem, amelynek eredményeképpen ezekben a fajokban az egyes számú foszforilációs hely hiányzik (Ohnishi, 1973; Nosek és Fukuhara, 1994). Az élesztő gombákra jellemző az intronok által kódolt fehérjék nagy száma (Pon és Schatz, 1991). Ezen fehérjék egy része az őket kódoló intronok mRNS-ből történő kivágását indukálja (maturáz funkció), másik csoportjuk DNS szinten fejt ki hatását: az intronok transzpozícióját illetve delécióját katalizálja (Ciriacy, 1993; Lambowitz és Belfort, 1993).

Mutációk a mtDNS-en

Egy genetikai rendszer felépítésének, működésének és öröklődésének tanulmányozásában a mutációk hasznos eszköznek bizonyultak (Piskur, 1994). Az élesztő gombák egy csoportjában a kódoló szakaszokban bekövetkezett mutációk nem feltétlenül vezetnek a sejt halálához, mert ezek nem, vagy rosszul működő mitokondriumok mellett is életképesek maradnak. Ha a mitokondrium nem funkcionál, az élesztő gomba a biológiai oxidáció helyett áttér az erjesztéssel való energiahasznosításra amennyiben a rendelkezésére álló szénforrás ilyen úton felhasználható. Minthogy az erjesztés során nyert energia sokkal kisebb, ezek a gombák a normálisnál („grand”) kisebb („petite”) telepeket képeznek. Azokat az élesztő gombákat, amelyek nem funkcionáló mitokondriumok mellett is életképesek petite pozitívoknak, azokat amelyek nem, petite negatívoknak nevezzük (Bulder, 1964).

Nem, vagy rosszul funkcionáló mitokondrium kialakulhat a magi („nukleáris petite”) vagy a mitokondriális („citoplazmás petite”) DNS-en bekövetkezett mutáció következtében. A mtDNS-en bekövetkező káros mutációkat különböző csoportokra oszthatjuk. Az egyetlen mitokondriális gént érintő mutációt *mit*⁻ mutációnak nevezzük. Ha a mutáció a mitokondriális fehérjeszintézisben szerepet játszó gént érint, *syn*⁻ mutációról beszélünk. A *syn*⁻ mutációk hatása pleiotróp jellegű, minden mtDNS által kódolt fehérje hiányzik a mutánsokból. A ρ ⁻ mutánsok a mtDNS nagy méretű delécióival és a megmaradó szakaszok amplifikációjával jönnek létre (Bernardi, 1982; Rayko és Goursot, 1996). Szélsőséges esetben a mtDNS egésze is hiányozhat (ρ^0).

Különböző antibiotikumok ill. gátlóanyagok az egyes mitokondriális funkciókat specifikusan blokkolják, megátolva ezáltal az élesztők növekedését nem-fermentálható szénforrásokon. A mitokondriális fehérjeszintézist gátló anyagok közé tartozik a kloramfenikol és az eritromicin, míg az oligomicin, a diuron és a mucidin a ter-

minális oxidáció és az oxidatív foszforiláció egyes lépéseit blokkolják. Azokat a mutánsokat, amelyek ezen gátló anyagokra érzéketlenek, rezisztens mutánsoknak hívjuk. Rezisztens mutánsok kialakulhatnak pontmutációk és kis méretű deléciók következtében is.

Mitokondriális mutánsok kis gyakorisággal spontán is előfordulnak a természetben, de gyakoriságuk különböző mutagén kezelésekkel (UV-sugárzás, etidium-bromid, $MnCl_2$) növelhető.

2.1.2 Lineáris DNS plazmidok

A lineáris DNS plazmidok felépítése

Az utóbbi két évtizedben számos mikroszkópikus gomba fajtából izoláltak DNS plazmidokat, melyek felépítésükben lineárisaknak bizonyultak (Meinhardt és mtsai, 1990). A legújabb eredmények alapján az eddig megvizsgált 1800 élesztő gomba törzs közül kevesebb, mint egy tucatban tudták kimutatni jelenlétüket (Fukuhara, 1995), míg fonalas gombákban széles körben elterjedtek (Griffiths, 1995).

A plazmidok sejten belüli elhelyezkedésében lényeges különbség mutatkozott a két gomba csoport között: élesztőkben a citoplazmában, fonalas gombákban a mitokondriumokban található.

A lineáris DNS plazmidok felépítésére általánosan jellemző a végükön található TIR szekvencia, valamint az 5' végükhöz kötött fehérje molekula (Kikuchi és mtsai, 1984; Stam és mtsai, 1986; Vierula és mtsai, 1990; Court és Bertrand, 1992). Hasonló jelenséget írtak le adenovírusok (Rekosh és mtsai, 1977) és a *Bacillus subtilis* $\phi 29$ (Salas és mtsai, 1978) fágja (duplaszálú DNS vírusok) esetében, ahol ez a fehérje molekula primerként funkcionálva feltételezhetően részt vesz a vírus DNS replikációjában. Elképzelhető, hogy a gomba lineáris DNS plazmidokhoz kapcsolt

fehérjék hasonló funkciót látnak el, s replikációjuk a vírusokéval megegyező módon zajlik. A replikáció más típusú mechanizmusát feltételezi az 5' véghez kötött fehérje molekula hiánya és egy nagy ARS (*autonomously replicating sequence*) aktivitással rendelkező szekvencia jelenléte egy bazidiomicéta faj, a *Lentinus edodes* plazmidján (Katayose és mtsai, 1990).

A lineáris DNS plazmidok másik közös tulajdonsága az általuk hordozott virális DNS illetve RNS polimerázzal homológ szekvencia. Ez további bizonyítékul szolgál arra, hogy a plazmidok rendelkeznek az önmaguk replikációjához és transzkripciójához szükséges információval, illetve hogy a lineáris DNS plazmidok virális genomok leszármazottai lehetnek. Ha elfogadjuk a mitokondriumok eredetére vonatkozó endoszimbionta elméletet, akkor a fonalas gombák lineáris DNS plazmidjai az endoszimbionta baktérium fágjai lehettek. Ez az elmélet azonban nem magyarázza az élesztő gombák lineáris DNS plazmidjainak eredetét, hiszen ezek a mitokondriumokon kívül, a citoplazmában helyezkednek el. A plazmidok által kódolt DNS- illetve RNS-polimerázok aminosav szekvenciáinak összehasonlító elemzése során kapott törzsfák is alátámasztják a citoplazmatikus és a mitokondriális lokalizációjú lineáris DNS plazmidok különböző csoportba tartozását. Elképzelhető azonban, hogy a közös eredetű plazmidok az evolúció során gazdaszervezeteikhez adaptálódtak és ezáltal a plazmidok közti rokonsági kapcsolatok a különböző gomba taxonok közti rokonsági kapcsolatot tükrözik (Rohe és mtsai, 1992).

A lineáris DNS plazmidok funkciója

A lineáris DNS plazmidok funkciójáról mindmáig igen keveset tudunk. Széleskörű elterjedésük mellett a legtöbb esetben kriptikusak, vagyis jelenlétük vagy hiányuk a gazdaszervezetben semmilyen fenotipikus hatást nem eredményez (Mohan és mtsai, 1984; Kistler és Leong, 1986; Tudzynski és Esser, 1986; Kitada és Hishinuma, 1987; Shepherd és mtsai, 1987; Qin és mtsai, 1993; Cong és mtsai, 1994; Lim és Howlett,

1994; Hermanns és mtsai, 1995a; Hermanns és mtsai, 1995b). Az adenovírusokkal mutatott nagyfokú szekvencia és szerkezeti felépítésbeni hasonlóság vezetett ahhoz az elképzeléshez, hogy a lineáris DNS plazmidok egy, a virális funkciójukat elvesztett intracelluláris parazita rendszereknek tekinthetők, melyek hatékonyan replikálódnak, biztosítva ezáltal saját fennmaradásukat a gazdaszervezetükön belül.

Néhány esetben azonban a lineáris DNS plazmidok jól körülhatárolt funkcióval rendelkeznek. Élesztő gombákban a legismertebb lineáris DNS plazmidok a *Kluyveromyces lactis* pGKL1 és pGKL2 plazmidjai (Gunge és mtsai, 1981), melyek együttes előfordulása a gazdasejt killer fenotípusát eredményezi (Stark és mtsai, 1990). A kisebb plazmidon (pGKL1) kódolt fehérje toxin elpusztítja a toxinra érzékeny, plazmidot nem hordozó törzsek sejtjeit. A kisebb plazmid felelős a toxin iránt mutatott immunitásért is, hiszen hiánya nem csak a killer fenotípus, hanem a rezisztencia elvesztéséhez is vezet. A nagy plazmid (pGKL2) elvesztése együttjár a kisebb elvesztésével. Feltételezhetően a nagy által kódolt DNS ill. RNS polimeráz a kisebb plazmid replikációjához is elengedhetetlenül szükséges (Schaffrath és mtsai, 1995).

Hasonló, két plazmid együttes előfordulásával összekapcsolt killer fenotípust írtak le egy másik élesztő gomba, a *Pichia acaciae* esetében (Worsham és Bolen, 1990), ahol szintén a kisebb plazmid (pPacI-2) hordozza mind a toxin gént, mind az immunitásért felelős régiót. A *P. acaciae* és a *K. lactis* által termelt toxinok nagyfokú hasonlóságot mutatnak (McCracken és mtsai, 1994). Mindkét toxin egy három alegységből álló, kitináz aktivitással rendelkező fehérje molekula, melynek pH optimuma 7–7,5 közé esik. A fehérjék hatásmechanizmusára vonatkozó vizsgálatok a toxinra érzékeny törzsek sejtjeinek a sejtciklus G1 fázisában történő leállítását bizonyították.

Két további, ismert funkciójú plazmid a *maranhar* (Court és mtsai, 1991) és a *kalilo* (Myers és mtsai, 1989), melyeket fonalas gombákból — *Neurospora crassa* és

Neurospora intermedia — izoláltak. Mindkét plazmid autonóm módon replikálódik a mitokondriumokon belül; szekvencia homológiát sem egymással, sem a mitokondriális genommal nem mutatnak („valódi mitokondriális plazmidok”), mégis hasonló módon épülnek be a mtDNS-be. A plazmidok integrálódása indítja el a gazdasajtban azt az öregedési folyamatot („senescencia”), amely végső soron a tenyészet pusztulásához vezet (Griffiths, 1992). Ennek közvetlen oka a hibás mtDNS molekulák felhalmozódása, mely a normális mitokondriális működést meggátolja. Más esetben lineáris DNS plazmid jelenléte a mitokondriumon belül éppen „hosszú életű” fenotípus kialakulását eredményezheti (Hermanns és mtsai, 1994).

Egyedülálló jelenséget figyeltek meg egy nyálkagomba faj, a *Physarum polycephalum* esetében, ahol a plazmid (mF) a baktériumok konjugatív plazmidjához (F plazmid) hasonló feladatot lát el, a mitokondriumok „szexualitásában” van fontos szerepe (Kawano és mtsai, 1995). A plazmid felelős a mitokondriumok közötti fúzió és a mtDNS-ek közti rekombináció elindításáért, a plazmidot hordozó mF⁺ és plazmid-mentes mF⁻ törzsek közti keresztezésekben. Az utódok mitokondriumi rekombináns mtDNS-t tartalmaznak és hordozzák a plazmidot.

A lineáris DNS plazmidok további lehetséges funkciójára — például a plazmid tartalom és a patogenitás kapcsolatára egyes *Claviceps* törzseknél (Gessner-Ulrich és Tudzynski, 1994) — vonatkozó feltételezések kísérletileg megalapozatlanok.

2.1.3 Gomba vírusok és víruszerű partikulumok (VLP)

A gomba vírusok felépítése és replikációja

Az első gomba vírusokat több, mint 30 évvel ezelőtt izolálták *Agaricus bisporus*-ból (Hollings, 1962), de kiterjedt kutatásuk csak a *Penicillium fumiculosum* kettősszálú RNS (dsRNS) vírusa interferon termelését indukáló hatásának felfedezésével indult el (Kleinschmidt, 1988). Mára az ismert vírushordozó gomba törzsek száma 100 fölé

emelkedett (Lemke, 1976; Buck, 1986).

Valódi gomba vírusok (mikovírusok) közé azok a vírusok tartoznak, melyek a gombasejteken belül replikálódnak. A partikulumok egyesével vagy laza csoportokban szétszóródva helyezkednek el a gombasejtek citoplazmájában. A gombavírusok igen változatos morfológiával rendelkeznek. A legelterjedtebb az izometrikus forma (Buck, 1986), de találtak már merev és hajlékony pálcát, bakteriofág formát (fej és farok résszel rendelkező) (Kozlova, 1973), retrovírusszerű (Boeke és Sandmeyer, 1991) partikulumokat, de előfordulnak „csupasz”, vagyis kapsziddal nem rendelkező alakok is (Esteban és mtsai, 1993). A legtöbb gomba vírus kapszidja egyrétegű, amelyet azonos polipeptid alegységek építenek fel. A polipeptid lánc hossza és a kapszidot felépítő alegységek száma változó. A mikovírusok genomját az esetek túlnyomó többségében kettősszalú RNS molekula alkotja. Mindössze egy-egy esetben írtak le egyszálú RNS (ssRNS) illetve kettősszalú DNS (dsDNS) genommal rendelkező gombavírust (Buck, 1986). A vírus genomja a kapszid fehérjét, valamint az önmaga replikációjához szükséges dsRNS függő RNS polimerázt kódolja. A kapsziddal nem rendelkező dsRNS vírusok esetén az RNS-en csak a replikációhoz szükséges RNS polimeráz gént tudták azonosítani (Esteban és mtsai, 1993).

Penicillium stoloniferum (PsV-S) és *S. cerevisiae* (L-A) víruson végzett kísérletek azt bizonyítják, hogy a gombák dsRNS vírusainak replikációja — a reovírusokéval megegyező módon — aszinkron folyamat. Első lépésben a dsRNS molekula transzkripciója egy (+) ssRNS molekulát eredményez, amely a partikulumból kiszabadul. A gazda citoplazmájában mRNS-ként funkcionál, majd becsomagolódik. Rajta, mint templáton, megindul a (-) szál szintézise így alakul ki a duplaszalú forma. „Density labeling” kísérletek eltérő replikációs mechanizmust igazoltak a két faj esetében. A *S. cerevisiae*-nél a szülői RNS szálak együttmaradnak és az újonnan szintetizálódott (+) ssRNS szál jut ki a partikulumból (konzervatív replikáció). Ezzel szemben a



P. stoloniferum-nál az újonnan szintetizálódott (+) szál marad együtt a (-) szülői szállal (szemikonzervatív replikáció).

A mikovírusok sejten kívüli életciklusának létezésére nincs közvetlen bizonyíték. Következésképpen horizontális transzmissziójuk (vírus átvitel egyazon nemzedéken belül) valószínűleg kizárólag intracelluláris utakon, közvetlen citoplazma kontaktuson keresztül valósul meg. Hifa anasztomózisok útján történő vírus terjedés számos fonalas gomba faj esetén kísérletesen igazolt (Buck, 1986). A vertikális transzmisszió (a szülői és az utód nemzedék közti vírus átvitel) hatékonyságának megállapítására vonatkozó kísérletek azt bizonyítják, hogy az átvitel ivartalan (konídio-, klamido-, és uredo-) spórákon keresztül igen hatékony. Az ivaros spórákon keresztül megvalósuló transzmisszió hatékonyságáról az eredmények megoszlanak. Néhány gomba fajnál ez igen hatékonyan bizonyult (Schisler és mtsai, 1963; Koltin és Day, 1976), ugyanakkor *Aspergillus nidulans*-szal végzett kísérletek a vírus aszkospórákból történő kizáródását jelezték (Coenen, személyes közlés). Ennek ellenére a spórák útján történő átvitel a gombavírusok terjedésének valószínűleg leghatékonyabb módja. Laboratóriumi körülmények között vírus átvitel protoplaszt fúzió útján megvalósítható. Az izolált vírus partikulumokkal való fertőzési kísérletek nem hoztak jó eredményeket.

A gomba vírusok funkciója

A gomba vírusokkal való fertőződés következtében a gazdaszervezetben általában semmilyen fenotipikus változás nem tapasztalható, ezek a vírusok tehát kriptikusak. Egyes fitopatogén gombáknál a vírus jelenléte hipovirulenciát, a gomba csökkent mértékű patogenitását eredményezi. Ennek egyik legszebb példája a *Cryphonectria parasitica* dsRNS vírusa, ahol a vírus feltételezhetően bizonyos gazdagének regulációját zavarja, csökkentve ezáltal a patogenitást (Nuss, 1992). Hasonlóan, csökkent virulenciát mutatnak a vírushordozó *Gaeumannomyces graminis* és *Helminthosporium*

victoriae törzsek is (Ghabrial, 1988). Ezzel ellentétben megnövekedett virulenciát tapasztaltak a vírushordozó *Phytophthora infestans* és *Rhizoctonia solani* törzseknél (Finkler és mtsai, 1988).

Vírus és gazdaszervezete közti mutualisztikus kölcsönhatás tapasztalható a *S. cerevisiae* és L-A illetve M vírusai között. Mind az L-A, mind az M vírus 39 nm nagyságú izometrikus partikulum, mindkét vírus kapszidját az L-A genomján kódolt 76 kD nagyságú fehérje alegységek (Gag) építik fel. Az L-A partikulumon belül egyetlen 4,6 kb nagyságú, lineáris dsRNS molekula található, míg az M partikulumok egy vagy két 1,8 kb dsRNS-t tartalmaznak. Ez abból következik, hogy M mérete az L-A dsRNS-ének kevesebb mint a fele, így a replikáció során az M partikulum két dsRNS molekulával telik meg és csak az ezen felüli (+) szál fog kikerülni a citoplazmába („headful” replikáció; Wickner, 1993a). A mindkét dsRNS replikációjához szükséges RNS-függő RNS polimerázt az L-A vírus kódolja. Így az M vírus replikációja és fennmaradása L-A függvénye. Az M vírus genomján kódolt az a toxin fehérje, amely a vírushordozó *S. cerevisiae* törzsek killer fenotípusát eredményezi és ez felelős továbbá a toxinnal szembeni immunitásért is. Számos különböző killer toxint (K_1 , K_2 stb.) mutattak ki, melyeket különböző M dsRNS-ek (M_1 , M_2 stb.) kódolnak. Egy adott törzs csak egyfajta M dsRNS-t tartalmaz, ezáltal csak egyfajta toxint termel. A toxin egy preprotoxin formájában képződik, ami egy 44 aminosavas leader szekvenciából, egy α és egy β peptidből, valamint egy γ rezisztencia faktorból épül fel. A toxin érési folyamata során a leader szekvencia lehasad, a visszamaradt protoxinban a rezisztencia faktor rész glükozilálódik, ezt követően egy proteolitikus hasítás révén a γ rezisztencia faktor kivasad, így az α és β peptidek szabaddá válnak. Az őket összekötő S-S hidak kialakulása az érési folyamat utolsó lépése. A szekretálódott toxin-dimer az érzékeny sejtek sejtfa receptoraihoz kapcsolódik, majd a sejtmembrán receptoraihoz szállítódik. A sejtmembránban a toxin molekulák által kialakított pórusokon keresztül ionáramlás indul meg, megszüntetve

ezáltal a membrán két oldala között fennálló elektrokémiai potenciált. E folyamat végső soron a sejt halálához vezet.

A vírus replikációjában, fennmaradásában valamint a killer toxin termelésben alapvető szerepet játszanak a gazdasejt bizonyos génjei is (Wickner, 1993b). Több mint 30 azon MAK (*maintenance of killer*) gének száma, melyek az M vírus fennmaradásához szükségesek. Ugyanakkor ezen gének közül mindössze három (MAK3, MAK10 és PET18) szükséges az L-A fenntartásához. A KEX (*killer expression*) gének által kódolt proteázok az aktív toxin termelésben játszanak szerepet. A SKI (*super killer*) gének által termelt fehérjék valószínűleg a vírus mRNS-k transzlációjának gátlása révén vesznek részt a vírus fennmaradás szabályozásában. A SEC (*secretion*) gének a toxin szekréciójában, a KRE (*killer resistant*) gének a toxin hatás kialakításában, a REX (*resistance expression*) gén a rezisztencia megnyilvánulásában játszanak szerepet.

Hasonló, dsRNS vírus jelenlétével összefüggő killer aktivitást tapasztaltak *Ustilago maydis* törzseknél is, ahol a toxin az érzékeny sejtek mRNS és rRNS-einek degradálásával fejt ki gátló hatását. A törzsek analízise három különböző killer típus (P1, P4, P6) létezését bizonyította (Koltin és Steinlauf, 1980; Koltin és mtsai, 1980). Mindegyik típus ellenálló az önmaga által termelt toxinnal szemben, de érzékeny a másik kettő által termelt toxinra. Az egyes típusok keresztezésekor a kapott utódok csak az egyik szülői típushoz hasonlítottak: P4 x P1 és P4 x P6 keresztezésből mindig P4, míg P1 x P6 keresztezésből killer aktivitással nem rendelkező utódok származtak. Ezek az eredmények egy olyan restriktív-modifikációs rendszer meglétét feltételezik, amely egyes dsRNS-ek szelektív elpusztítását és megőrzését teszi lehetővé.

2.2 A *Phaffia rhodozyma* jellemzése

1976-ban Miller és munkatársai egy új élesztő gomba faj, a *Phaffia rhodozyma* részletes jellemzését közölték (Miller és mtsai, 1976). A napjainkig izolált, e fajhoz tartozó törzsek lombhullató fák kérgéről, hideg éghajlatú területekről (Alaszka, Szibéria, valamint Japán hegyvidéki területei) származnak. Eredeti élőhelyével hozható összefüggésbe azon jellemző tulajdonsága, hogy csak alacsony hőmérsékleten (25 °C alatt) képes növekedni. Vegetatívan sarjadzással szaporodik, ivaros életciklusának hiányában a Deuteromycota tagozatba sorolták (Kreger-van Rij, 1984).

A Deuteromycota tagozatba tartozó imperfect gombák aszkomicéta vagy bazidiomicéta eredetének megállapítására használt kritériumok alapján (Kreger-van Rij, 1987) — a sejtfal lemezes szerkezete, a sarjképzés módja, a sejtek karotinoid pigment tartalma és ureáz aktivitása, valamint a pozitív Diazónium Blue B teszt — a *P. rhodozyma* bazidiomicéta eredetű. Az új fajt a ballisztospóráképzés hiánya, fermentációs képessége valamint az a tény, hogy színanyagának 85%-a asztaxantin, melyet más élesztő gombában nem sikerült kimutatni, elkülöníti a többi karotinoid-termelő fajtól, így új nemzetségbe (*Phaffia*) sorolták.

Az elmúlt években vált ismertté, hogy a *Cryptococcus* nemzetség tagjaihoz hasonlóan a *P. rhodozyma* sejtfala is tartalmaz xylózt (Weijman és mtsai, 1988a), így a két nemzetség tagjait mindössze a fermentációs képesség különíti el. Ezt a tulajdonságot egyes szerzők nem fogadják el lényeges elkülönítő bélyegként, így a *Cryptococcus* és *Phaffia* nevet szinonímnak tekintették (Weijman és mtsai, 1988b). Ezzel szemben az összehasonlító szekvencia analízisek a *Phaffia* nemzetség önálló létezésének jogosultságát bizonyították. Részletes, prokariótákon végzett filogenetikai vizsgálatok alapján a riboszómális RNS szekvenciájának vizsgálata alkalmas lehet evolúciós rokonsági fok becslésére, hiszen minden fajban megtalálható, szerkezete és funkciója igen konzervatív (Fox és mtsai, 1988). Bazidiomicéta élesztők 18S

és 26S rRNS részleges szekvencia adatainak összehasonlítása a *Phaffia* és a *Cystofilobasidium* nemzetség közeli rokonságára utaltak (Guého és mtsai, 1989; Yamada és mtsai, 1990; Nakase és mtsai, 1993), ugyanakkor igazolták, a *Phaffia* nemzetség önálló, a *Cryptococcus* nemzetségtől való független létezését.

A legújabb kutatási eredmények bebizonyították, hogy a törzsek többsége meghatározott körülmények között — nitrogénforrás megvonása (Kucsera és mtsai, 1995) illetve polyol-tartalmú táptalajon való tenyésztés (Golubev, 1995) — képes szexuális reprodukcióra. Az ivaros ciklus az anya és a sarjsejt közötti konjugációval kezdődik (pedogámia), majd ezt követi a holobazidium létrejötté ovális, apikálisan álló bazidiospórákkal. Ez a fajta szaporodási ciklus eddig ismeretlen volt a bazidiomicéta élesztők körében, így Golubev a teleomorf alakot új névvel, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a Basidiomycota tagozat új nemzetségébe helyezte át.

A *Phaffia rhodozyma* biotechnológiai jelentőségét színanyag tartalmának — melynek nagy része asztaxantin, kisebb hányada β -karotin — köszönheti. Az asztaxantin (3,3'-dihidroxi-4,4'-dioxo- β -karotin) az élővilágban széles körben elterjedt β -karotin származék, mely állatokban (rákok, halak) és növényekben egyaránt megtalálható, de bioszintézisére csak növények és mikroorganizmusok képesek. Az asztaxantin gazdasági jelentőségét egyes halfajok (lazac, pisztráng) tenyésztésében való nagy mennyiségű felhasználása adja. Természetes életkörülmények között a lazacfélék húsa jellegzetes színű, melyet a táplálékkal felvett asztaxantin eredményez. A tenyésztett állatok — a természetes asztaxantin források hiánya miatt — nem rendelkeznek ezzel a színanyaggal, így a piacon az irántuk megnyilvánuló kereslet jóval alacsonyabb. A természetes szín eléréséhez a táplálékhoz kevert, szintetikus úton előállított asztaxantin magas ára a tenyésztést gazdaságtalanná teszi. Így merült fel az igény természetes asztaxantin források felkutatására (Johnson és An, 1991; Nelis és De Leenheer, 1991). A *Phaffia rhodozyma* megfelelő lenne erre a célra (Lewis, 1990),

gazdaságos alkalmazását azonban nagyban gátolja lassú, alacsony hőmérsékleten történő növekedése, valamint alacsony asztaxantin tartalma. Így számos laboratóriumban indultak meg az asztaxantin bioszintézis útjának felderítésére irányuló biokémiai kutatások (Bramley és Mackenzie, 1992), valamint a pigmenttartalom fokozását célzó törzsnemesítési eljárások (An és mtsai, 1991; Chun és mtsai, 1992; Adrio és mtsai, 1993; Palágyi és mtsai, 1995).

Az utóbbi időszakban megnövekedett az érdeklődés β -karotint termelő *Phaffia rhodozyma* mutánsok iránt is (Girard és mtsai, 1994). A β -karotin felhasználása (mint természetes ételszínezék és A provitamin) széles körű, biotechnológiai előállítására jelentős gazdasági igény mutatkozik. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a karotinoidok — ezen belül különösen a β -karotin — antikarcinogén tulajdonsággal rendelkeznek, antioxidánsként közvetlenül reakcióba lépnek aktív oxigéngyökökkel, védőrendszert képezve ezáltal a genotoxikus károsodásokkal szemben (Schroeder és Johnson, 1993).

Az intenzív biokémiai és biotechnológiai kutatások ellenére a faj genetikai jellemzése csak az utóbbi években kezdődött el. Elektroforetikus kariotípusának felderítésére közel azonos időben került sor két egymástól független kutatócsoport által (Nagy és mtsai, 1994; Adrio és mtsai, 1995). Mindkét csoport jelentős kromoszómahossz polimorfizmust írt le a fajon belül. A vizsgált törzsekben a kromoszómális sávok száma 7–13 illetve 9–17 között változott. A becsült genom méret 15,4–23,2 Mb illetve 16,69–26,74 Mb, ez nagyságrendjét tekintve megegyezik más élesztő gombák genomjának méretével. A törzsek közti nagy kromoszómahossz polimorfizmus felvette a vizsgált törzsek egy fajhoz való tartozásának kérdését. Ez vezetett azon molekuláris szintű vizsgálatokhoz, amelyek a fajon belüli variabilitást fehérje és DNS szinten elemezték (Varga és mtsai, 1995). A törzsek RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) mintázatában és az elektroforetikus kariotípusában mutatkozó

nagyfokú különbségek ellenére, az izoenzim és a riboszómális DNS vizsgálata során kapott eredmények az izolátumok egy fajba való tartozását támasztották alá.

Egy 1987-ben megjelent közlemény lineáris DNS plazmidok jelenlétéről számolt be *P. rhodozyma* ATCC 24210 törzsben (Wilber és Proffitt, 1987), a plazmidok sejten belüli elhelyezkedése, felépítése és funkciója azonban mindmáig ismeretlen.

3 Felhasznált mikroorganizmusok és anyagok

3.1 Mikroorganizmusok

Aspergillus foetidus CBS 618.78

Escherichia coli DH5 α

Escherichia coli HB101

Phaffia rhodozyma ATCC 24203

Phaffia rhodozyma ATCC 24203 *lys*⁻, yellow

Phaffia rhodozyma ATCC 24229

Phaffia rhodozyma ATCC 24261

Phaffia rhodozyma CBS 5905

Phaffia rhodozyma CBS 5905 1/1 jelzésű petite izolátuma

Phaffia rhodozyma CBS 5908

Phaffia rhodozyma CBS 6938

Phaffia rhodozyma CBS 6938 *leu*⁻

Phaffia rhodozyma CBS 6938 *ile*⁻

Saccharomyces cerevisiae R14

Saccharomyces cerevisiae S6

Saccharomyces cerevisiae T 158C

3.2 Táptalajok, tápoldatok

2xYPD tápoldat

1% élesztőkivonat

2% pepton

2% glükóz

2xYPD táptalaj

2xYPD tápoldat

2,5% agar

0,05% YP táptalaj

0,05% élesztőkivonat

0,05% pepton

2% glükóz

2,5% agar

0,05% YPEtOH táptalaj

0,05% élesztőkivonat

0,05% pepton

2% etanol

2,5% agar

Vitaminos minimál tápoldat0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1% KH_2PO_4 0,05% MgSO_4

1% glükóz

0,1 ml Wickerham-féle vitaminoldat

YNB ribitolos táptalaj

0,67% yeast nitrogen base

1% adonitol

2,5% agar

Táptalaj killer aktivitás vizsgálatához

A komponens:

10 g élesztőkivonat

20 g pepton

20 g glükóz

20 g agar

880 ml desztillált víz

B komponens:

110 ml citromsav/ KH_2PO_4

pH 4,0–7,2 két tizedenként változtatva

C komponens:

30 g metilénkék

10 ml steril desztillált vízben oldva

Sterilizés után C komponenst hozzáadni A és B-hez.

LB tápoldat

1% trypton

0,5% élesztőkivonat

1% NaCl

pH 6,5

LB táptalaj

LB tápoldat

2% agar

TB (*terrific broth*) tápoldat 1000 ml

A oldat:

12 g trypton

24 g élesztőkivonat

4 ml glicerin

900 ml-re feltölteni, sterilizálni

B oldat:

0,17 M KH_2PO_4

0,72 M K_2HPO_4

Kuktázással sterilizálni

Sterilizés után A oldathoz 100 ml B oldatot adni.

Mutagén kezeléshez használt tápoldatok

2xYPD tápoldat kiegészítve különböző koncentrációban etidium-bromiddal (10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Vitaminos minimál tápoldat kiegészítve cikloheximiddel (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

0,05% YP táptalaj rotenonnal (0,1; 0,5; 1,0; 5; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kiegészítve.

3.3 Oldatok, pufferek

Protoplasztok képzéséhez

Előkezelő oldat: 10 mM Trisz/HCl pH 8; 1mM EDTA

Enzim oldat: 0,5% csigaenzim; 0,25% NovoZym; 1,2 M KCl

Mitokondrium izoláláshoz használt oldatok

(1) 10 mM Trisz/HCl; 5 mM EDTA; 0,4 M szacharóz pH 7,5

(2) 10 mM Trisz/HCl; 100 mM EDTA; 0,4 M szacharóz pH 8

(3) 20 mM Trisz/HCl; 5 mM MgCl_2 ; 0,4 M szacharóz pH 7,5

Lízis puffer 1. (minilizátum készítéséhez)

50 mM Trisz/HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,5% SDS; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteináz K

Lízis puffer 2. (CsCl gradiensen történő DNS elválasztáshoz)

15 ml 0,2 M Trisz/HCl pH 8; 1,7 ml 0,1 M EDTA; 0,34 g szarkozin

VLP izoláláshoz használt oldatok

(1) 0,1 M foszfát puffer pH 7

(2) 0,1 M foszfát puffer (pH 7) kiegészítve 0,15 M NaCl; 7,5% PEG; 1% kloroform

LETS puffer totál DNS izoláláshoz

0,1 M LiCl; 10 mM EDTA; 10 mM Trisz/HCl pH 8; 0,5% SDS

DNS blottoláshoz és hibridizációhoz használt oldatok

A hibridizációs kísérletek során a Boehringer Mannheim cég „DIG DNA Labeling and Detection Kit”-jét használtuk.

A reagensek és oldatok nagy részét már elkészített formában hozza forgalomba a cég.

0,25 M HCl

0,4 M NaOH

0,2 M EDTA, pH 8

4 M LiCl

20xSSC (0,3 M Na-citrát, 3 M NaCl, pH 7)

Hibridizációs puffer (5xSSC, 0,1% N-laurylsarcosine, 0,02% SDS, 1% blocking reagens)

1. puffer (0,1 M maleinsav, 0,15 M NaCl, pH 7,5)

2. puffer (1% blocking reagens 1. pufferben oldva)

3. puffer (0,1 M Trisz/HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5)

Mosó pufferek:

(1) 2xSSC, 0,1% SDS

(2) 0,1xSSC, 0,1% SDS

dimetil-formamid

stripping oldat (0,2 N NaOH, 0,1% SDS)

Plazmid tisztításhoz használt oldatok

- (1. a) Reszuszpenziós oldat: 50 mM Trisz/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA
- (1. b) Lízis oldat: 0,2 M NaOH; 1% SDS
- (1. c) Neutralizáló oldat: 2,55 M K-acetát pH 4,8
- (2. a) 50 mM glükóz; 25 mM Trisz/HCl; 10 mM EDTA pH 8
- (2. b) 0,2 N NaOH; 1% SDS
- (2. c) 5 M kálium-acetát (60 ml); jégcet (11,5 ml); desztillált víz (28,5 ml)

Fenol/kloroform/izoamilalkohol

25 ml fenol; 24 ml kloroform; 1 ml izoamilalkohol

3.4 Festékek, reagensek

Agaróz (Reanal)

Adonitol (SIGMA)

Akril-amid (FLUKA AG)

Ampicillin (SIGMA) 10 mg/ml

Antimicin-A (Reanal)

Bórsav (Reanal)

Cézium-klorid (BDH Chemicals Ltd.)

Cikloheximid (SIGMA)

Coomassie Brilliant Blue (Reanal)

Ecetsav (Reanal)

EDTA (Reanal)

Etidium-bromid (SIGMA)

Hoechst 33258 (SIGMA) 100 mg/ml

IPTG (SIGMA) 25 mg/ml

Merkapto-etanol (Loba Feinchemie)

Metanol (Reanal)

Metilén-kék (Reanal)

N,N,N', N' tetrametil-p-feniléndiamin dihidroklorid (TMPD) 1%-os oldata

Rotenon (Reanal)

Dinátrium-szukcinát (FLUKA AG)

Trisz (Reanal)

Uranil-acetát 2%-os vizes oldata

x-gal (SIGMA) 25 mg/ml DMSO-ban oldva

Yeast nitrogen base (DIFCO)

3.5 Felhasznált enzimek

*Bal*31 (Amersham)

DNáz (Boehringer)

Lizozim (Reanal) 10 mg/ml

Proteináz K (Boehringer)

RNáz (SERVA) from bovine pancrease

S1 nukleáz (SIGMA)

T4 DNS ligáz (Boehringer)

Restriktációs endonukleázok:

*Bam*HI (Amersham)

*Hind*III (Amersham)

*Hae*III (Amersham)

*Pst*I (Amersham)

*Pvu*II (Amersham)

*Xba*I (Amersham)

Az enzimekkel történt kezelésekhez a gyártó cég által forgalmazott puffereket használtuk.

3.6 Felhasznált génpróbák

Candida parapsilosis ND6–ND1 gén (1,4 kb *DraI*–*DraI* fragment), COX3 gén (0,85 kb *AvaII*–*AccI* fragment), ND4L–ND5 gén (1,3 kb *BstBI*–*HindIII* fragment) pTZ18R plazmidba klónoztva (4-es klón).

Candida parapsilosis ND5 gén (0,8 kb *HindIII*–*AccI* fragment) és ATP8–ATP9 (1,3 kb *AccI*–*HindIII* fragment) pUC 19 plazmidba klónoztva (6-os klón).

PAnE3 *Aspergillus nidulans* LrRNS gén 6,7 kb *EcoRI* fragment pBR322 plazmidba klónoztva.

4 Felhasznált módszerek

4.1 Protoplasztképzés

36 órán át 2xYPD tápoldatban növesztett élesztő gomba tenyészetből a sejteket kiülepítettük (2 perc, 10000 g), majd felfuszpendáltuk 1% merkapto-etanolt tartalmazó előkezelőoldatban. 20 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és felfuszpendáltuk protoplasztáló enzim oldatban. Szobahőmérsékleten 3 órán át inkubáltunk.

4.2 Mitokondriumok izolálása

Mitokondriumok izolálásához a *P. rhodozyma* törzsekből szferoplasztokat képeztünk. A szferoplasztokat French press készülékben 4 °C-on 3000 Ψ nyomás értéken feltártuk. A továbbiak során a Rickwood és mtsai (1987) által leírt módszer lépéseit követtük.

4.3 Az oxigénfogyasztás mérése

Izolált mitokondriumok oxigénfogyasztását 20 °C-on „Clark” típusú oxigén elektróddal mértük Rickwood és mtsai alapján (1987).

4.4 Citokróm c-oxidáz teszt

A McEwen és mtsai (1985) által leírt módszerben a tenyésztési körülményeket megváltoztattuk: a vizsgálandó tenyészeteket 5 napig 20 °C-on inkubáltuk.

4.5 DNS elválasztás CsCl gradiensen

A magi és a mtDNS elválasztására a törzsekből 5×10^9 protoplasztot 5 ml lízis pufferben felfuszpendáltunk, 15 percig 60°C -on inkubáltunk, majd jégen lehűtöttük. 4°C -on 15 percig 12000 g-vel centrifugáltunk (Sorvall RC-5B Refrigerated Super-speed Centrifuge) (Williamson és Fennel, 1974) (Williamson és Fennel, 1974). A felülúszó 3,9 ml-éhez 100 μl Hoechst 33258 festéket és különböző mennyiségű (3,9 g; 4,0 g; 4,1 g; 4,3 g 4,5g) CsCl-t adtunk. 20°C -on 50000 rpm-mel 24 órát centrifugáltunk (Sorvall Pro80 Ultraspeed Centrifuge).

4.6 Totál DNS izolálás

0,2 g liofilezett élesztő gomba sejtet dörzs mozsárban elporítottunk, 2 ml LETS pufferben alaposan felkevertünk, majd 2 ml fenol/kloroform/izoamil-alkoholt adtunk az elegyhez és 4°C -on 10 percig 3000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszóhoz azonos mennyiségű etanolt adtunk. A DNS-t 30 percig -70°C -on kifagyasztottuk, majd centrifugálással (10 perc, 3000 g, 4°C) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, majd 600 μl desztillált vízben felfuszpendáltuk. Az így kapott DNS oldatot többszöri fenolozással tovább tisztítottuk. A végső tisztítási lépés után a DNS-t ismét kicsaptuk, végül 100 μl desztillált vízben szuszpendáltuk fel.

4.7 DNS blottolás és hibridizáció

Az agaróz gélelektroforézissel elválasztott DNS-t alkalikus transzfer módszerrel vittük át Hybond N+ membránra (Reed és Mann, 1985). A génpróbák digoxigennel történő jelölését és a hibridizációt a gyártó által előírt módon végeztük el. A hibridizációt, valamint a nem kötődött, jelölt DNS eltávolítását a filterről minden esetben 68°C -on végeztük el.

4.8 DNS fragmentek klónozása, baktérium transzformáció

A DNS fragmentumokat pKS vektorba ligáltuk. A ligálást T4 DNS ligázzal végeztük a gyártó által javasolt feltételek közt. Kompetens sejtek készítését és a sejtek transzformációját a Sambrook és mtsai (1989) által ismertetett módon hajtottuk végre. A DNS fragmentet hordozó transzformáns sejtek szelektálása 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillint tartalmazó táptalajon történt, melyre 40 μl x-gal-t és 40 μl IPTG-t szélesztettünk.

4.9 Plazmid tisztítás

Baktérium sejtekből alkalikus lízis módszerrel tisztítottunk DNS plazmidokat (Sambrook és mtsai, 1989). DNS szekvencia meghatározáshoz a plazmid tisztítás Kovalenko és mtsai (1994) szerint történt.

4.10 DNS szekvencia meghatározása

A klónozott DNS fragmentumok szekvenciájának meghatározását a Szegedi Biológiai Központban végezték el, ABIPRISM Model version 2.1.0 automata szekvenátorral.

4.11 Minilizátum készítése élesztőgombasejtekből

1,5 ml 36 órán át (ill. dsRNS izolálás esetén 5 napon át) 2xYPD tápoldatban növesztett élesztő gomba tenyészetből a sejteket kiülepítettük (2 perc, 10000 g), majd felfuszpendáltuk 1,5 ml 1% merkaptó-etanol tartalmazó előkezelőoldatban. 20 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és felfuszpendáltuk 1,5 ml protoplasztáló enzim oldatban. Szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltunk. Az inkubálási idő elteltével a szferoplasztokat centrifugálással kiülepítettük az enzimoldatból, mostuk 1,2 M KCl oldatban, majd felfuszpendáltuk 54 μl lízis pufferben. 1 óra 60 °C-on történő inkubáció után az elegyhez 10 μl

brómfenolkéket adtunk. 15 μ l-t vittünk fel agaróz géltre.

4.12 Nukleinsavak elválasztása gélelektroforézissel

A nukleinsavak elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk (Sambrook és mtsai, 1989). A dsRNS molekulák molekulásúlyának meghatározására figyelembe vettük a Livschits és mtsai (1990) által közzétett korrekciós faktort.

4.13 Víruspartikulumok izolálása

500 ml 5 napos 2xYPD-ben rázatott élesztőgombatenyészetből a sejteket kiülepítettük és szferoplasztokat képeztünk belőlük. A szferoplasztokat 100 ml hideg foszfát pufferben felfuszpendáltuk (ügyelve arra, hogy az így kapott szuszpenzió homogén legyen) és French press készülékben 10 000 Ψ nyomáson feltártuk. Az épen maradt sejteket és sejtörmeléket centrifugálással (30 perc, 4 °C, 15 000 g) kiülepítettük. A felülúszóhoz 0,15 M NaCl-ot, 7,5% PEG-et valamint 1% kloroformot adtunk és folyamatos keverés közben egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A kicsapódott víruspartikulumokat centrifugálással összegyűjtöttük (15 perc, 15 000 g, 4 °C) majd foszfát pufferben felfuszpendáltuk. A partikulumok további tisztítására az Oliver és mtsai (1977) által kidolgozott gradiens centrifugálásos módszert alkalmaztuk.

4.14 Elektronmikroszkópia

A víruspartikulumokat tartalmazó szuszpenziókból 2 μ l-t cseppentettünk gridekre (réz, 400 mesh). A felesleget 2–3 perc múlva szűrőpapírral eltávolítottuk. A preparátumokat 2% uranil-acetáttal festettük 30 másodpercig, majd desztillált vízzel mostuk (Hayat, 1973). Szárítás után Zeiss OPTON EM902 elektronmikroszkópban 500 000 x nagyításnál vizsgáltuk.

4.15 VLP-k elválasztása gélelektroforézissel

Az elválasztást 0,375% agaróz és 2,5% akril-amid tartalmú gélben (Goodwin és Dahlberg, 1982) 1xTBE pufferben 4 °C-on, 200 V feszültséggel 6 óra alatt hajtottuk végre. Futtatás után a gélt 1 órán át fixáltuk 45% metanolt és 10% ecetsavat tartalmazó oldatban, majd egy éjszakán át festettük 0,05% Coomassie Brilliant Blue-t tartalmazó 45% metanol és 10% ecetsav oldatban. A felesleges festéket 5% metanolt és 7,5% ecetsavat tartalmazó oldatban történő többszöri mosással távolítottuk el.

4.16 A törzsek killer aktivitásának vizsgálata

A vizsgálatot a szakirodalomban előírt módon hajtottuk végre (Philliskirk és Young, 1975). A felhasznált táptalajok pH-ja 4,0 és 7,2 közti tartományban 0,2-es lépésként változott. Érzékeny törzsekként *S. cerevisiae* S6 törzsét valamint dsRNS-t nem tartalmazó *P. rhodozyma* törzseket oltottunk masszívan a táptalajra. Toxintermelő törzsként *S. cerevisiae* T158 C törzsét és mind a hat *P. rhodozyma* törzset teszteltük.

4.17 A vírus átvitel vizsgálata

P. rhodozyma CBS 6938 *leu*⁻ és ATCC 24203 *lys*⁻, *yellow* törzsét 2xYPD tápoldatban előneveltük, 1:1 arányban összekevertük és YNB ribitolos táptalajon 18 °C-on spóráztattuk. A bazidiospórákat Jena Zeiss mikromanipulátorral izoláltuk, a fenotípusukat „replica plating” módszerrel határoztuk meg. A spórák dsRNS tartalmát azokban a tetradokban vizsgáltuk ahol a magi markerek 2:2 arányban szegregáltak.

4.18 A kromoszómális DNS elválasztása

Az agaróz blokkok elkészítését és a kromoszómális DNS elválasztását a Nagy és mtsai (1994) által leírt módon hajtottuk végre.

4.19 A vírusok vegetatív reprodukcióra gyakorolt hatása

CBS 6938 *leu*⁻, vírus-mentes (*vir*⁻) és CBS 6938 *leu*⁻, vírus-tartalmú (*vir*⁺) törzsek rázatott tenyészetéből óránként mintát vettünk. A sejtszámot Bürker-kamrás számolással állapítottuk meg. Az adatok statisztikai elemzésére lineáris regressziót, egy illetve kétmintás *t* próbát alkalmaztunk (Zar, 1984).

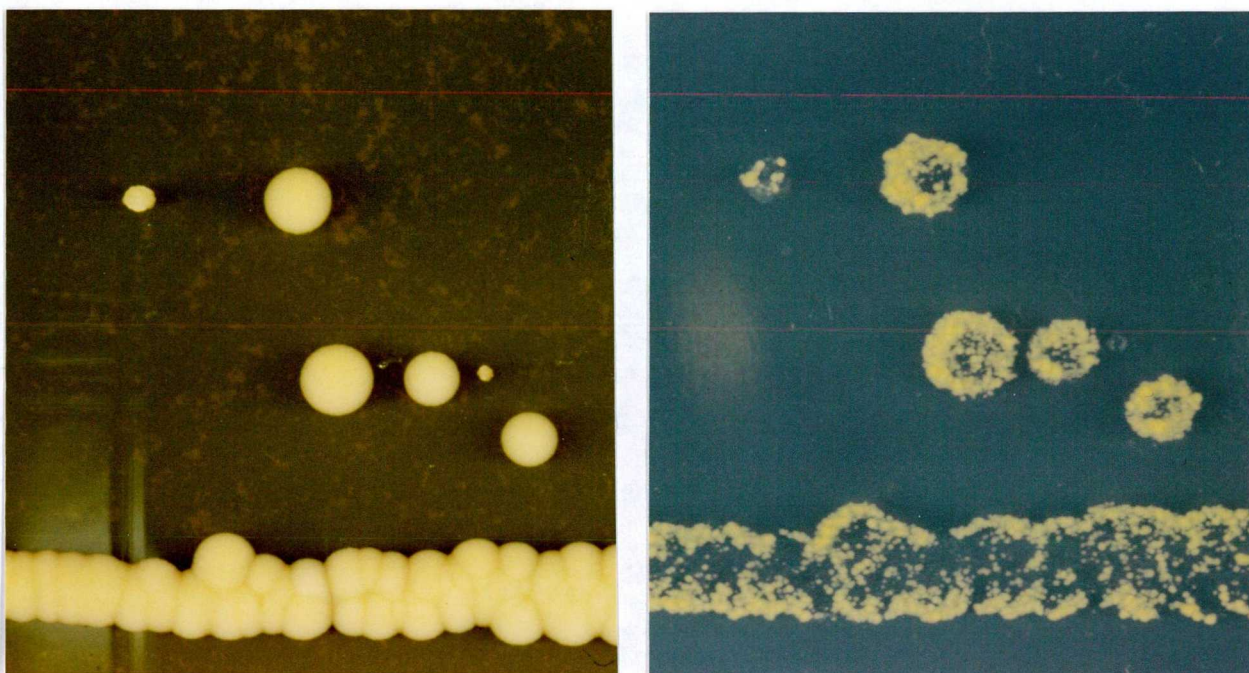
4.20 A vírusok ivaros szaporodásra gyakorolt hatása

A konjugációs, sporulációs és rekombinációs gyakoriságot CBS 6938 *leu*⁻, *vir*⁻ x CBS 6938 *ile*⁻ és CBS 6938 *leu*⁻, *vir*⁺ x CBS 6938 *ile*⁻ keresztezésekben vizsgáltuk. A konjugációs gyakoriságot és a spórázás intenzitását mikroszkóposan követtük. A keresztezésekben kapott spórákat összegyűjtöttük és minimál táptalajra (VMM) szélesztettük. 10 napos inkubáció után a táptalajon megjelent prototróf rekombinások száma adta a két törzs rekombinációs gyakoriságát. Az eredményeket χ^2 próbával értékeltük (függetlenség vizsgálat; Siegel és Castellan, 1988).

5 Eredmények, értékelés

5.1 Petite mutánsok izolálása

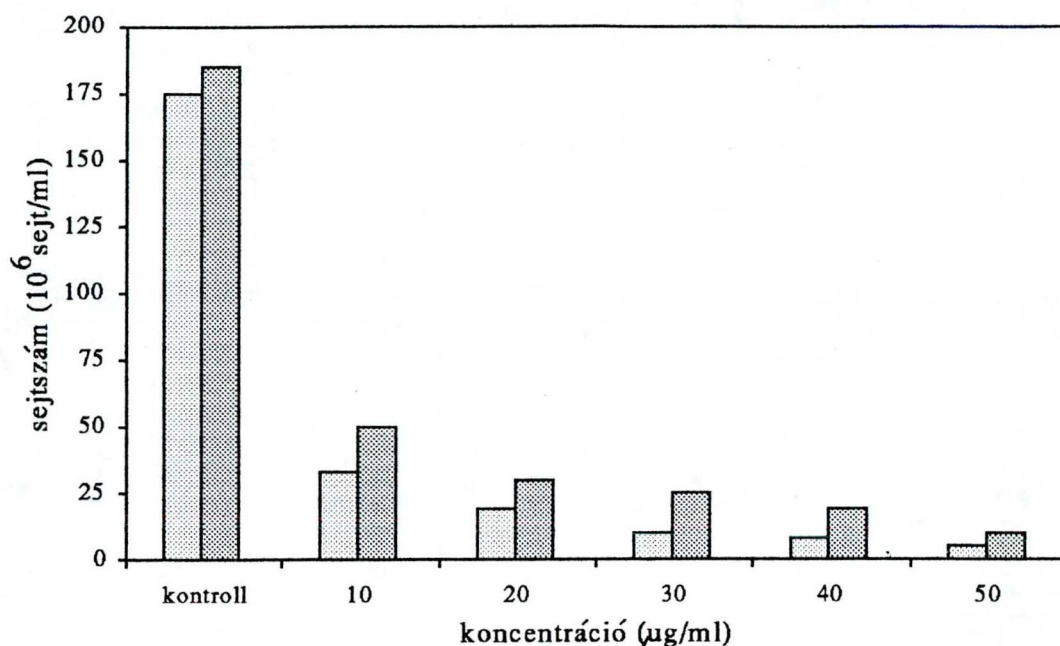
P. rhodozyma CBS 5905 törzsét komplett táptalajon tenyésztve a normál növekedésű telepek mellett kb. 1%-os gyakorisággal kisebb telepek is megfigyelhetők. A telepeket etanol, mint egyetlen szénforrást tartalmazó táptalajra átoltva, a kisebb telepek nem mutatnak növekedést (1. ábra).



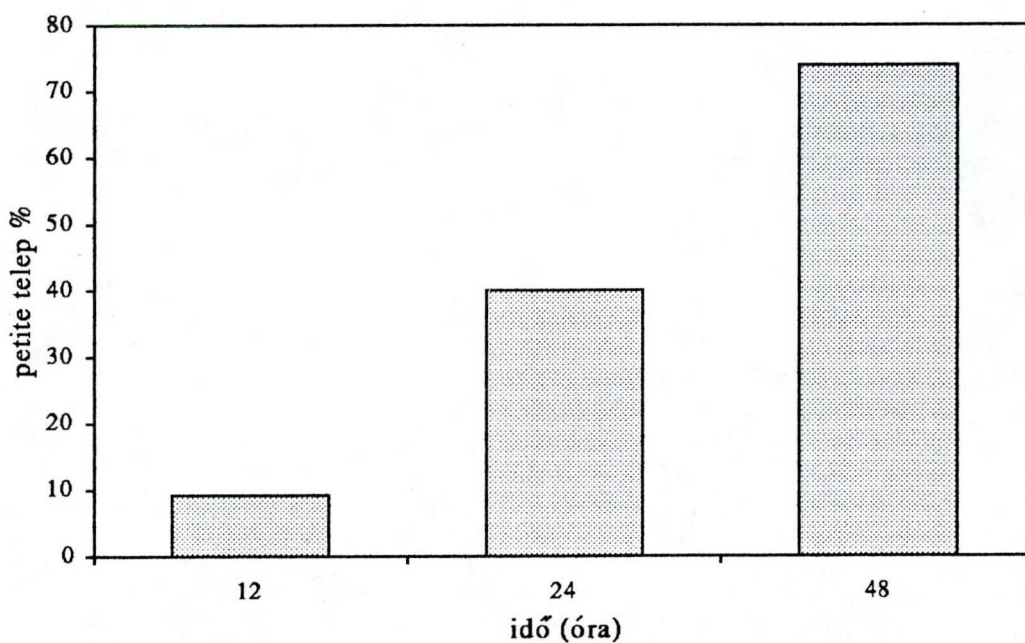
1. ábra. *P. rhodozyma* CBS 5905 törzse 2xYPD (bal) és 0,05xYPEtOH (jobb) táptalajon tenyésztve.

5.2 Petite mutáció indukálása

Petite mutáció indukálására etidium-bromidos kezelést alkalmaztunk. Az etidium-bromid gátló hatását különböző koncentrációknál (10; 20; 30; 40; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vizsgáltuk. A 2. ábra a sejtek növekedését mutatja a hatóanyag koncentráció függvényében.



2. ábra. A sejtszám változása az etidium-bromid koncentráció függvényében. A bal oldali oszlopok a 24 órás, a jobb oldaliak pedig a 48 órás kezelések eredményeit mutatják. A kiindulási sejtszám minden esetben 10^6 sejt/ml volt.



3. ábra. A petite telepek számának változása a kezelési idő függvényében.

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációnál a sejtek szaporodási intenzitása 20%-ra csökkent. Ezt az értéket kiválasztva vizsgáltuk a petite fenotípusú telepek előfordulási gyakoriságát a kezelési idő függvényében (3. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy 48 órás 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú etidium-bromiddal történő kezelés hatására a petite mutánsok előfordulási gyakorisága 74%-ra növelhető.

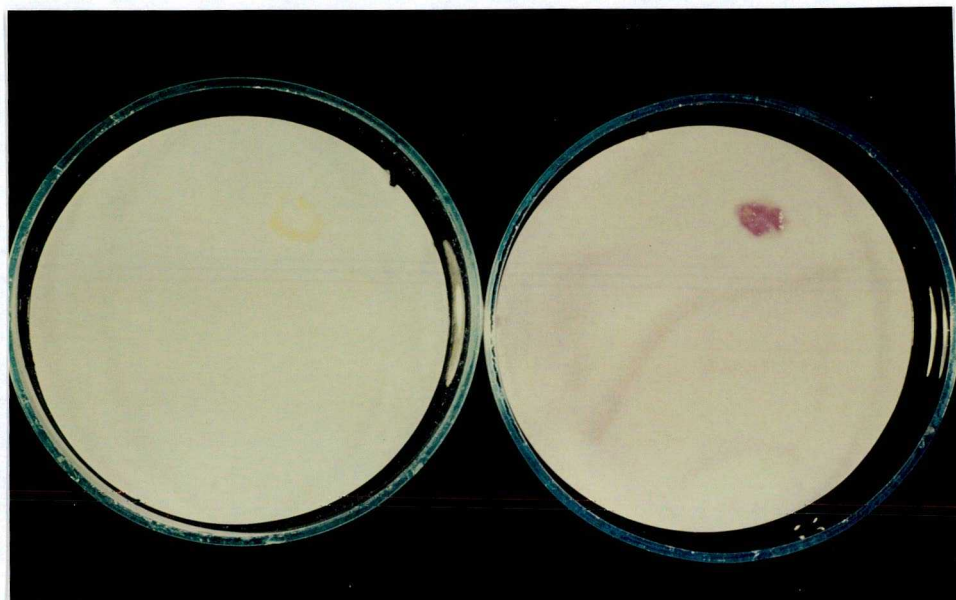
5.3 A mitokondriumok működésének vizsgálata

5.3.1 Citokróm-oxidáz próba

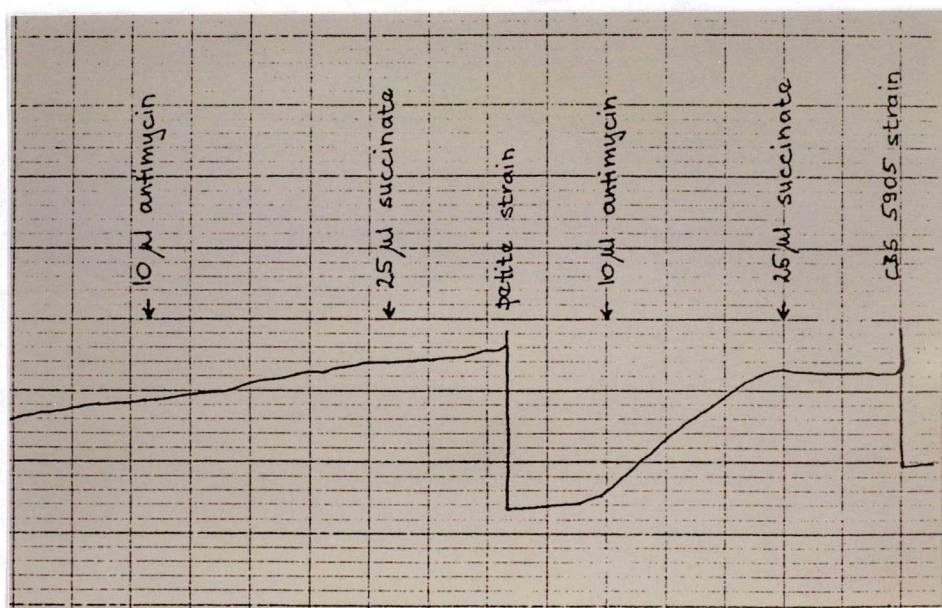
A szakirodalomban közzétett adatok alapján az N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilén diamin (TMPD) redox festék alkalmas citokróm c-oxidáz deficiens mutánsok kimutatására. A TMPD a terminális oxidáció végén a citokróm c-oxidáz által szállított elektronokat felvéve redukálódik. A redukált festék kék színű, míg az oxidált színtelen. Permeabilizált élesztő sejteket TMPD-vel festve kék színreakciót csak azon telepek körül tapasztalunk, melyek működő citokróm c-oxidázzal rendelkeznek. Kísérleteink során a CBS 5905 törzs, valamint spontán és etidium-bromid kezeléssel indukált petite mutánsainak citokróm c-oxidáz aktivitását vizsgáltuk. Pozitív, azaz kék színreakciót minden esetben csak a vad típusú törzsnél tapasztaltunk (4. ábra).

5.3.2 Az O_2 fogyasztás mérése

A grand és egy petite mutáns törzsből mitokondriumot izoláltunk. Megvizsgáltuk a mitokondriumok O_2 fogyasztását szukcinát jelenlétében, majd antimicin-A hozzáadása után. A grand törzs mitokondriumi szukcinát jelenlétében intenzív légzési aktivitást mutattak (25 μM O_2 /perc/mg protein). Antimicin hozzáadásával a folyamat leállt (5. ábra). A petite törzs mitokondriumi szukcinát, sem az antimicin hozzáadására nem reagáltak (5. ábra). A fenti eredmények alapján az általunk izolált petite fenotípusú telepek valódi petite mutánsok, vagyis kialakulásuk



4. ábra. Citokróm c-oxidáz aktivitás.

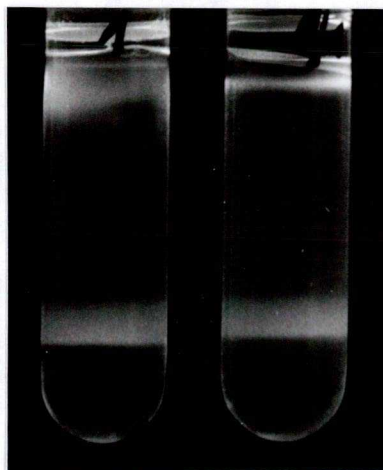
5. ábra. A CBS 5905 törzs és 1/1 jelzésű spontán petite izolátumának O₂ fogyasztása.

a mitokondriumok hiányos működésére vezethető vissza.

5.4 A mitokondriális DNS jellemzése

5.4.1 mtDNS izolálás

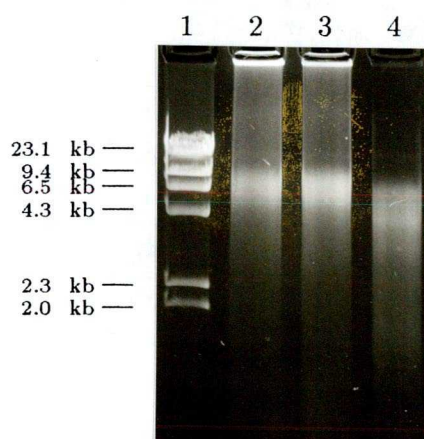
A grand és a petite törzs mtDNS-ei közti különbség felderítésére mindkét törzsből mtDNS-t próbáltunk izolálni CsCl gradiensen. Megállapítottuk, hogy a magi és a mitokondriális DNS úszó denzitása mindkét törzsben megegyezik, így a CsCl koncentrációjának változtatásával is minden esetben csak egy-egy sávot lehetett észlelni a gradiensen (6. ábra). Mindezek alapján ezzel a módszerrel a magi és a mtDNS nem különíthető el egymástól. Ezért a mtDNS tisztításhoz mitokondriumokat izoláltunk mindkét törzsből. A mitokondriumokat lizáltuk, majd a lizátumot CsCl gradiensre vittük. A grand törzsben 1 sávot kaptunk, míg a petite törzsben nem volt DNS. Ez azt jelenti, hogy az általunk izolált spontán petite mutáns ρ^0 , vagyis mtDNS-t nem tartalmaz.



6. ábra. A CBS 5905 törzs (bal) és 1/1 (jobb) jelzésű spontán petite izolátumának CsCl gradiensen izolált DNS-e.

5.4.2 A mtDNS felépítésének vizsgálata

A CsCl gradiensen tisztított mtDNS-t különböző koncentrációjú *Bal31* enzimmal emésztettük annak eldöntésére, hogy lineáris vagy cirkuláris felépítésű-e. 0,1 U/ μ l koncentrációnál már jelentős rövidülést tapasztaltunk, míg ötszörös mennyiségű enzimmal azonos ideig történő kezelés hatására a teljes DNS elbomlott (7. ábra).

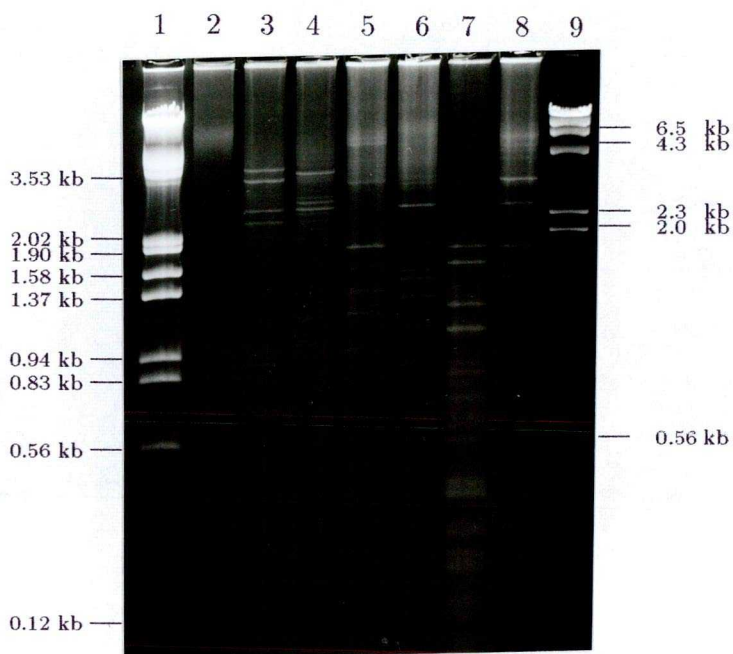


7. ábra. A CBS 5905 törzs intakt mtDNS-ének *Bal31* emésztett képe. 1. *HindIII*-emésztett λ DNS; 2. kontroll mtDNS; 3. mtDNS 0,01 U; 4. mtDNS 0,1 U *Bal31*-gyel emésztve

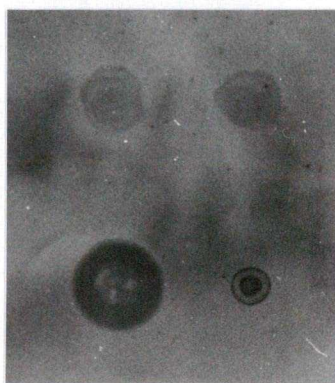
A mtDNS teljes méretének meghatározásához restrikciós enzim analízist végeztünk. A különböző enzimekkel történt hasítás során kapott fragmentek méretét összeadva a teljes mtDNS megközelítőleg 13 kb nagyságúnak bizonyult (8. ábra).

5.4.3 Mitokondriális gének azonosítása

A rendelkezésünkre álló mitokondriális génpróbák felhasználásával „dot blott” hibridizációt hajtottunk végre a CBS 5905 törzs, és 1/1 jelű petite izolátuma (kontrollként *S. cerevisiae* R14 törzs) totál DNS preparátumaihoz, valamint a CBS 5905 törzsből származó mtDNS preparátumhoz. A hibridizáció minden esetben pozitív eredményt adott (9. ábra).



8. ábra. A CBS 5905 törzs mtDNS-ének RFLP mintázata. 1. Boehringer marker III. 2. emésztetlen mtDNS, 3. *Xba*I-; 4. *Pvu*II-; 5. *Pst*I-; 6. *Hind*III-; 7. *Hae*III-; 8. *Bam*HI-emésztett mtDNS; 9. *Hind*III-emésztett λ DNS.



9. ábra. Hibridizáció *Candida parapsilosis* 6-os klónjával. *S. cerevisiae* R14 (bal felső), *P. rhodozyma* CBS 5905 (jobb felső), CBS 5905 törzs izolált mtDNS-e (bal alsó), klónozott *Xba*I fragment (jobb alsó).

Megvizsgáltuk a törzsek rotenon-érzékenységét 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 és 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú rotenont tartalmazó táptalajon. 10 napos inkubáció után a törzsek növekedési intenzitása a kontrollhoz viszonyítva nem változott.

A fenti eredmények tükrében, a *Candida parapsilosis* génpróbáival kapott pozitív eredmény feltételezésünk szerint a génpróbákön található ATPáz 8 – ATPáz 9 illetve a COX 3 géneknek köszönhető, hiszen a *P. rhodozyma* törzsek rotenonnal szembeni rezisztenciája arra utalhat, hogy az 1. számú foszforilációs hely (rotenon-érzékeny) ebben az élesztő fajban is hiányzik. Ezt a kísérletet azonban nem tekinthetjük bizonyító erejűnek, hiszen a rezisztencia jelentheti azt is, hogy a törzsek nem képesek a rotenon felvételére.

5.4.4 DNS szekvencia meghatározása

A CBS 5905 törzsből származó mtDNS-t *XbaI* enzimmal emésztettük, a fragmenteket pKS vektorba klónoztuk és szekvenáltuk. Eddig mindössze egy 0,6 kb méretű fragment szekvenciájával rendelkezünk, amellyel aminosav szintű homológiákat kerestünk SwissProt adatbázisban. Citokróm c-oxidáz fehérjéknek fragmentünkkel mutatott homológiája alapján valószínűsíthető, hogy az általunk klónozott fragment egy hasonló funkcióval rendelkező fehérje molekula egy szakaszát kódoló DNS. A teljes szakaszra a homológia átlagosan 60%, de a réz-kötő helyek 100%-os homológiát mutatnak (10. ábra).

5.5 dsRNS vírusok és DNS plazmidok

A birtokunkban levő *Phaffia rhodozyma* törzsek minilizátumainak agaróz gélelektroforézissel történt vizsgálata öt törzsből a magi DNS mellett számos további sáv jelenlétét igazolja. A minták DNÁzzal illetve RNÁzzal való kezelése azt bizonyítja, hogy a sávok többsége DNS, de négy törzsből RNS sávokat is sikerült azonosítanunk

<i>Ph. rhodozyma</i>	102	YYQQ	C	QRL	C	CLM	H	SFLPQSI	43
<i>B. naardensis</i>	214	YYGQ	C	SEL	C	GVM	H	SAMPIKI	233
<i>B. nanus</i>	213	YYGQ	C	SEL	C	GVM	H	SSMPIKI	234
<i>B. anomalus</i>	209	YYGQ	C	SEL	C	GVM	H	SSMPIKI	228
<i>B. custersii</i>	211	YYGQ	C	SEL	C	GVM	H	SSMPIKI	230
<i>B. custersianus</i>	213	YYGQ	C	SEL	C	GVM	H	SSMPMKV	232
<i>P. sativum</i>	217	YYGQ	C	SEI	C	GTN	H	AFMP	233
<i>V. unguiculata</i>	277	YYGQ	C	SEI	C	GTN	H	AFMP	293
		** *		*		**		* ** *	

10. ábra. A 0,6 kb *Xba*I fragment DNS szekvenciájából lefordított aminosav szekvencia összehasonlítása más fajok citokróm c-oxidázainak aminosav szekvenciáival. A bekeretezett aminosavak a réz-kötő helyeket jelzik. Csillaggal a minden szekvenciában azonos vagy homológ aminosavakat jeleztük. B: *Brettanomyces*; P: *Pisum*; V: *Vigna*.

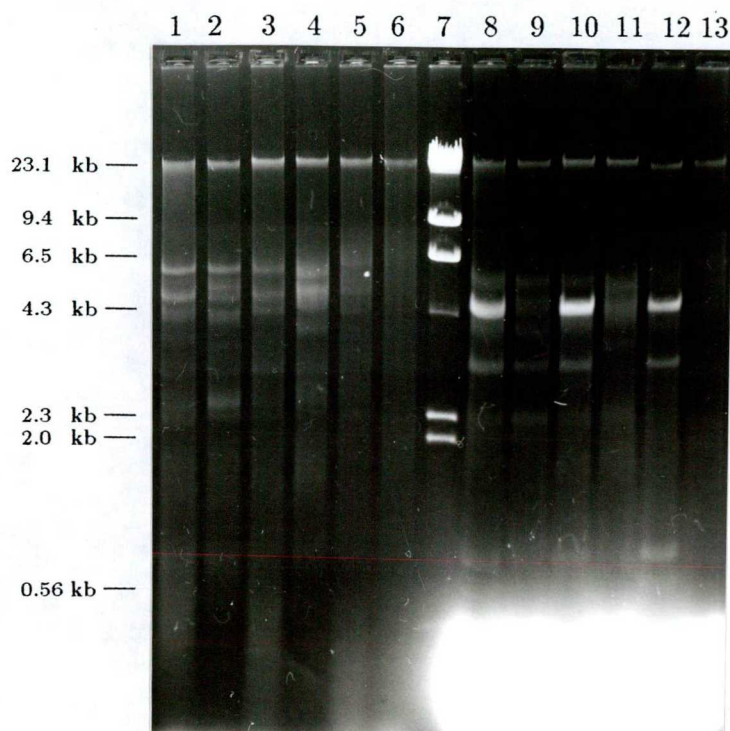
(11. ábra).

5.6 A dsRNS mintázat

Az RNS molekulák S1 nukleázzal, valamint magas sókoncentráció mellett RNázal szembeni rezisztenciája azt bizonyítja, hogy duplaszálúak. Két törzs (CBS 5908, ATCC 24261) négy különböző méretű dsRNS molekulát tartalmazott: 0,77; 0,97; 3,7 és 4,3 kb. Egy törzs (ATCC 24203) három különböző dsRNS molekulát tartalmazott, melyek 0,97; 3,7 és 4,3 kb-nak bizonyultak. Egy 3,7 kb nagyságú dsRNS-t találtunk az ATCC 24229 törzsben. Két törzsben (CBS 5905 és CBS 6938) nem tudtunk dsRNS-t kimutatni (12. ábra).

5.7 Víruszerű partikulumok izolálása és jellemzése

Annak eldöntésére, hogy a *P. rhodozyma* dsRNS-ei víruszerű partikulumok genomját alkotják vagy burok nélküli „csupasz” formában találhatóak a sejtekben, VLP-

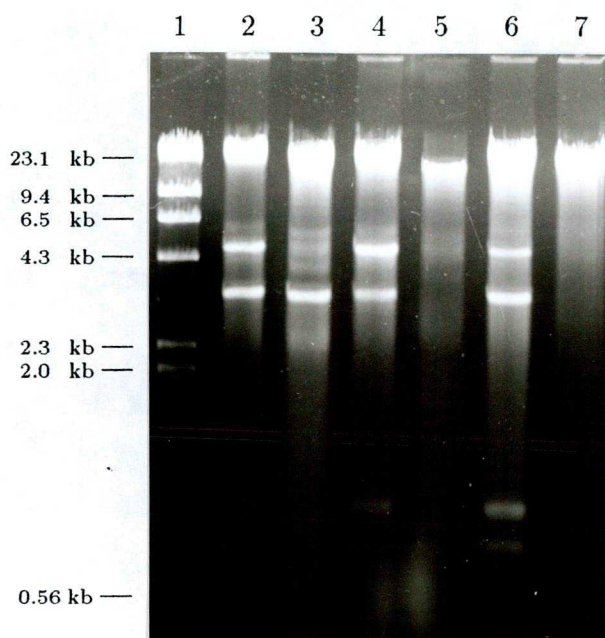


11. ábra. *P. rhodozyma* törzsek minilizátumainak gélelektroforézissel elválasztott képe. 1–6. a minták RNáz kezelés után; 7. *Hind*III-emésztett λ DNS; 8–13. a minták RNáz kezelés nélkül. 1. és 8 ATCC 24261; 2. és 9. ATCC 24229; 3. és 10. ATCC 24203; 4. és 11. CBS 6938; 5. és 12. CBS 5908; 6. és 13. CBS 5905

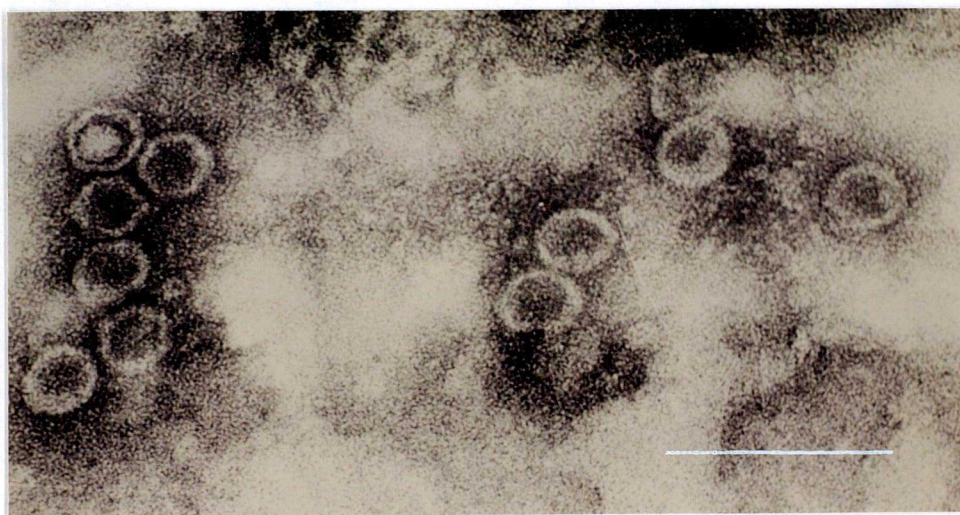
ket izoláltunk a dsRNS-t tartalmazó törzsekből. A dsRNS-t tartalmazó törzsek közül háromból sikerült VLP-ket izolálnunk, az ATCC 24229 törzsből azonban nem. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok azt bizonyították, hogy mindhárom törzsben azonos típusú, ikozaéderez felépítésű, 34 x 26 nm méretű partikulumok találhatók (13. ábra). Egy típusú VLP jelenlétét támasztotta alá a partikulumok elválasztására alkalmazott gélelektroforézis is az ATCC 24203 törzsben (14. ábra).

Az ATCC 24203 törzs VLP frakciójának nukleinsav tartalmát vizsgálva kimutattuk, hogy a 3,7 kb méretű dsRNS molekula nem található meg ebben a frakcióban (15. ábra).

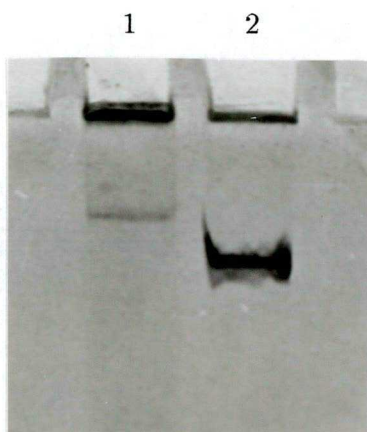
Eredményeink alapján a 0,77; 0,97 és a 4,3 kb nagyságú dsRNS molekulák



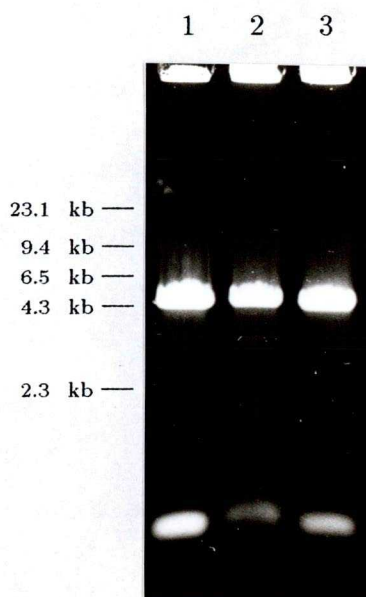
12. ábra. *P. rhodozyma* törzsek dsRNS mintázata. 1. *Hind*III-emésztett λ DNS; 2. ATCC 24261; 3. ATCC 24229; 4. ATCC 24203; 5. CBS 6938; 6. CBS 5908; 7. CBS 5905



13. ábra. Az ATCC 24203 törzs VLP-inek elektronmikroszkópos képe. A képen feltüntetett egység 100 nm-t jelöl



14. ábra. Az ATCC 24203 törzs VLP-inek agaróz gélelektroforézissel elválasztott képe. 1. *P. rhodozyma* ATCC 24203 törzs; 2. *Aspergillus foetidus* CBS 618.78



15. ábra. Az ATCC 24203 törzs VLP-iből izolált dsRNS-k gélelektroforetikus képe. A minták három független izolálásból származnak

vírusszerű partikulumok genomját alkotják. Feltételezzük, hogy a 3,7 kb méretű dsRNS molekula, ami mind a négy vírus-hordozó törzsben megtalálható — hasonlóan a *S. cerevisiae* T és W elemeihez — „csupasz”, vagyis fehérje burokkal nem rendelkezik.

5.8 Mutagén kezelés hatása a dsRNS molekulákra

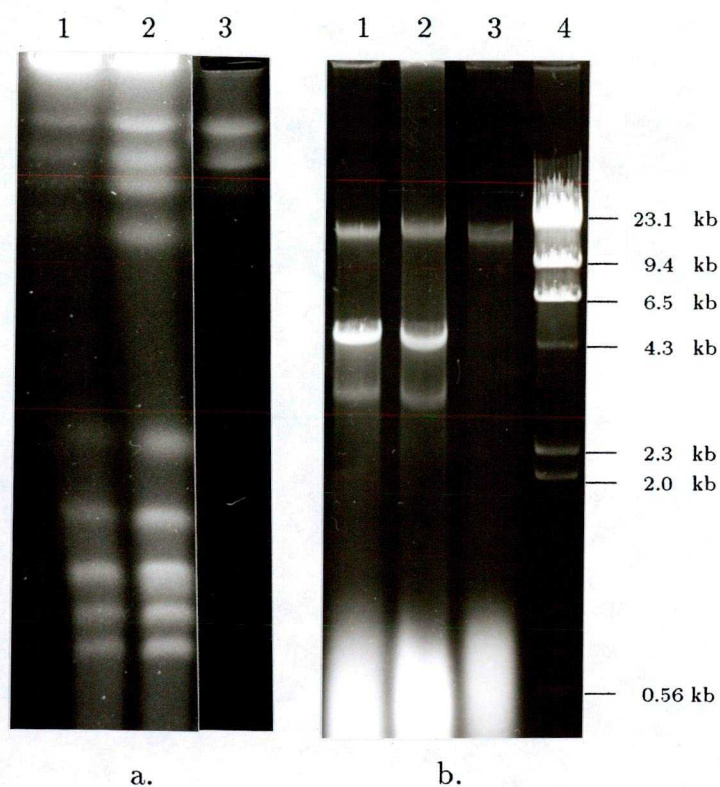
dsRNS molekulák hőkezeléssel, UV besugárással vagy vegyszeres kezelés hatására kitörölhetnek a sejtekből (Fink és Styles, 1976). Munkánk során az UV, a cikloheximid és az etidium-bromid hatását vizsgáltuk a *P. rhodozyma* dsRNS molekuláira. Az ATCC 24203 törzset UV fénnel besugározva 1%-os túlélésnél véletlenszerűen kiválasztott telepekből izoláltunk dsRNS-t. A cikloheximid hatását 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, az etidium-bromidét 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentráció értéknél vizsgáltuk. Mindkét esetben 48 óras rázatott tenyészetben történt inkubáció után izoláltunk dsRNS-t a tenyészetekből. Esetünkben egyik fajta kezelés sem bizonyult hatásosnak. Meg kell említenünk, hogy *P. rhodozyma* auxotróf és szín mutánsok előállítására munkatársaink által hatékonyan alkalmazott γ besugárzás hatására sem törlődtek a dsRNS molekulák a sejtekből.

5.9 A dsRNS vírusok gazdaszervezetre gyakorolt hatásának vizsgálata

5.9.1 A vírusok hatása a vegetatív reprodukcióra

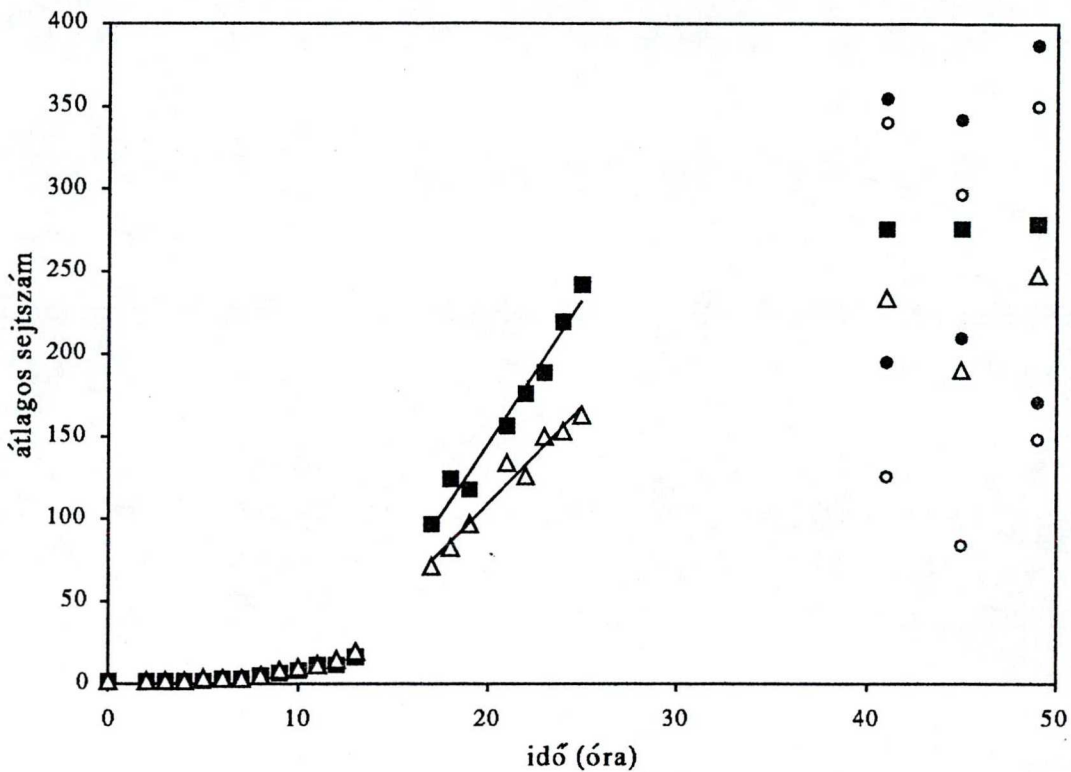
dsRNS-mentes és dsRNS-t tartalmazó törzsek keresztezése révén sikerült olyan utódot izolálnunk, amely vírushordozó volt, ugyanakkor a vírus-mentes szülői törzs kromoszóma készletével rendelkezett (16a. és b. ábra). Ezen törzs, valamint a vírus-mentes szülői törzs sejtszámának változását Bürker-kamrás számolással követtük, majd az adatok alapján mindkét törzs növekedési görbáját felvettük (17. ábra).

Statisztikai elemzések alapján a két törzs logaritmusos fázisban mért növekedési rátája (t próba, $0,5 > p > 0,2$) és a törzsek által a stacioner fázisban elért sejtszám (41 és 49 órás adatok; kétmintás t próba, $p > 0,1$; minták szórásának azonossága: f próba, $p < 0,01$) közt nincs szignifikáns eltérés. Tehát a vírus jelenléte nem folyásolja be kimutatható mértékben a sejtek osztódási ütemét és nincs számottevő hatása az elérhető sejtszámra.



16.a. ábra. 1. CBS 6938 *leu*⁻, *vir*⁻; 2. CBS 6938 *leu*⁻, *vir*⁺ törzsek kromoszóma mintázata; 3. *Schizosaccharomyces pombe* 972 *h*⁻.

16.b. ábra. 1. CBS 6938 *leu*⁻, *vir*⁻; 2. ATCC 24203 *lys*⁻, *yellow*; 3. CBS 6938 *leu*⁻, *vir*⁺; törzsek plazmid mintázata; 4. *Hind*III-emésztett λ DNS.



17. ábra. A CBS 6938 *leu*⁻, *vir*⁻ és *vir*⁺ törzsének növekedési görbéje. Δ : *vir*⁺; \blacksquare : *vir*⁻; Az ábrán feltüntettük a regressziós egyeneseket ($r^2=0,97$ mindkét esetben). A 41, 45 és 49 órás adatoknál feltüntetett körök az átlag \pm szórás értékeket jelentik.

5.9.2 A vírusok hatása az ivaros szaporodásra

Meghatároztuk a fenti kísérletben használt két törzs konjugációs gyakoriságát, sporulációs intenzitását és rekombinációs gyakoriságát. A statisztikai elemzések nem mutattak szignifikáns eltérést, a két törzs konjugációs gyakoriságában (18. ábra). A sporulációs és rekombinációs gyakoriság tekintetében csak 1 illetve 0,5 %-os szignifikancia szinten találtuk azonosnak a két törzset, így ezek további vizsgálatok tárgyát képezik.

	<i>vir</i> ⁻		<i>vir</i> ⁺		χ^2	
konjugáció	40	(5889)	33	(5733)	0,50	p>0,5
sporuláció	30	(5889)	13	(5733)	6,30	p>0,01
rekombináció	213	(2,025.10 ⁵)	160	(1,15.10 ⁵)	7,20	p>0,005

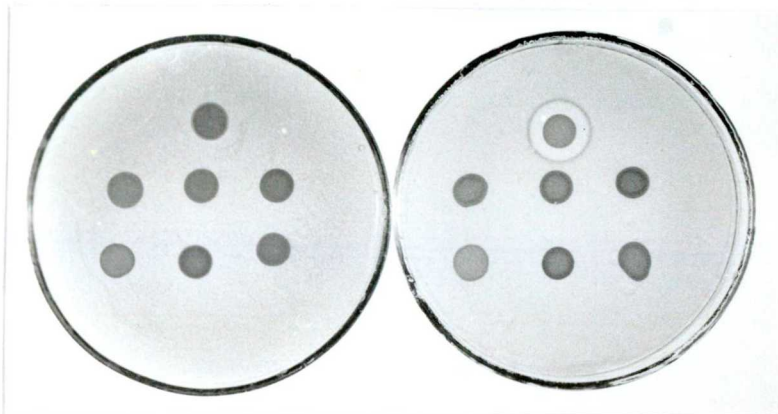
18. ábra. A CBS 6938 *leu*⁻, *vir*⁻ és *vir*⁺ törzsének konjugációs gyakorisága, sporulációs intenzitása és rekombinációs gyakorisága. Zárójelben a megvizsgált sejtek számát tüntettük fel.

5.9.3 Killer aktivitás vizsgálata

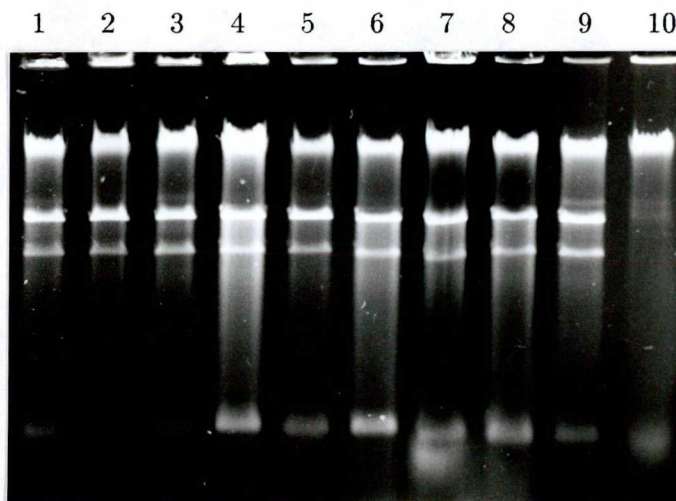
Korábbi eredmények alapján dsRNS vírusok jelenléte a *P. rhodozyma*-ban összefügg a gazdaszervezet killer aktivitásával (Castillo és Cifuentes, 1994). Az általunk elvégzett kísérletek ezt nem támasztották alá. A *P. rhodozyma* dsRNS vírusainak killer aktivitását különböző pH-jú táptalajokon teszteltük. A kiterjedt vizsgálatok ellenére sem sikerült a vírus hordozó törzsek vírusmentes törzsekre gyakorolt toxikus hatását kimutatni (19. ábra).

5.10 A dsRNS-ek transzmissziója

A dsRNS-ek ivaros spórákon át történő transzmissziójának nyomon követéséhez egy dsRNS-mentes (CBS 6938 *leu*⁻) és egy dsRNS-t tartalmazó (ATCC 24203 *lys*⁻, *yellow*) törzset kereszteztünk, majd vizsgáltuk a spórák dsRNS mintázatát. Megállapítottuk, hogy a dsRNS-ek ivaros spórákon keresztül történő transzmissziója a *P. rhodozyma* esetében igen hatékony (100%), hiszen az általunk vizsgált spórák mindegyike tartalmazta a szülői törzs mindhárom típusú dsRNS-ét (20. ábra).



19. ábra. Killer aktivitás vizsgálata. A csészéket masszívan oltottuk *P. rhodozyma* CBS 6938 törzssel (bal) illetve *S. cerevisiae* S6 törzssel (jobb). A következő törzsek killer aktivitását vizsgáltuk: *S. cerevisiae* T 158C (felső sor); *P. rhodozyma* CBS 5905, CBS 5908, CBS 6938 (középső sor), ATCC 24203, ATCC 24229, ATCC 24261 (alsó sor)



20. ábra. A dsRNS-ek transzmissziója. 1–8. két tetrad nyolc bazi-diospórájából származó dsRNS-k; 9. ATCC 24203 *lys*⁻, *yellow*; 10. CBS 6938 *leu*⁻.

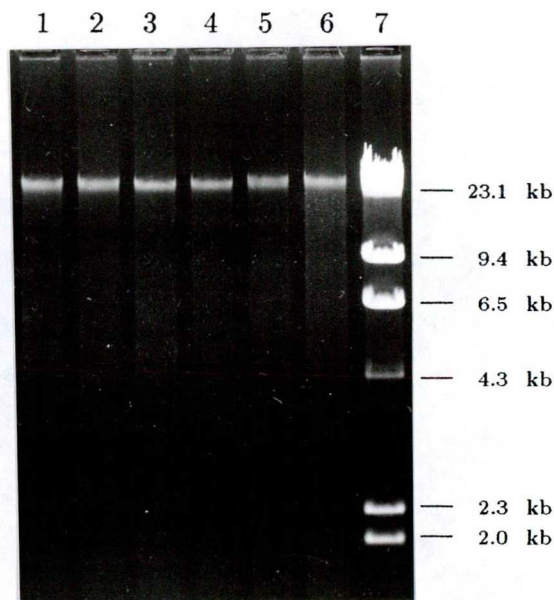
5.11 A DNS plazmidok vizsgálata

P. rhodozyma CBS 5908, CBS 6938, ATCC 24203, ATCC 24229 és ATCC 24261 törzsében számos DNS plazmid található a 2,0–6,5 kb tartományban (11. ábra).

A plazmidok és a magi DNS CsCl gradiensen CsCl gradiensen történő elválasztására irányuló kísérleteink nem jártak eredménnyel, ennek magyarázata a két fajta DNS úszó denzitásának megegyezése.

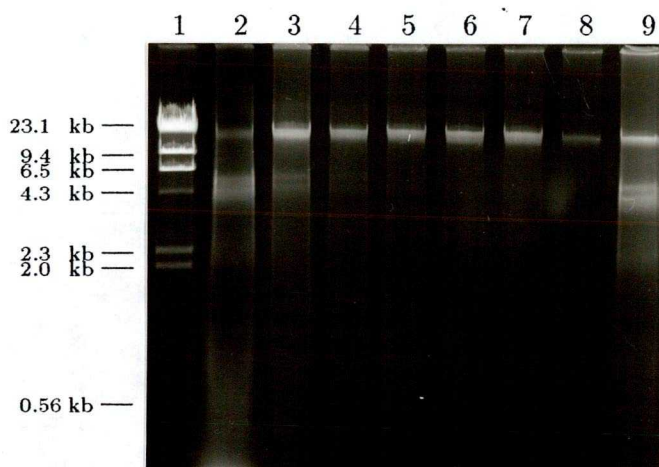
5.12 Mutagén kezelés hatása a DNS plazmidokra

Megvizsgáltuk az etidium-bromid DNS plazmidokra gyakorolt hatását. Már 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú, 24 órás etidium-bromid kezelés elegendőnek bizonyult a DNS plazmidok hatékony kitörlésére a sejtekből (21. ábra).



21. ábra. *P. rhodozyma* törzsek minilizátumainak gélelektroforetikus képe etidium-bromid kezelés után. 1. ATCC 24261; 2. ATCC 24229; 3. ATCC 24203; 4. CBS 6938; 5. CBS 5908; 6. CBS 5905; 7. *Hind*III-emésztett λ DNS

A plazmidok elvesztésével egyidejűleg azonban leállt a sejtek osztódási folyamata is. Ha ekkor a sejteket az etidium-bromid tartalmú tápoldatból kimostuk és etidium-bromidot nem tartalmazó tápoldatba vittük át, az osztódás egy idő után ismét megindult. A tenyészetből 3 óránként mintát véve vizsgáltuk, hogy van-e valamiféle összefüggés sejtek DNS plazmid tartalma és az osztódási folyamat megindulása között. Az idő előrehaladtával egyre nagyobb számú plazmidot tudtunk izolálni a tenyészetből, végül 24 óra elteltével helyreállt az eredeti DNS plazmid mintázat (22. ábra). A plazmidok és az osztódási folyamat közti összefüggésre jelenleg még nem ismerjük a magyarázatot.



22. ábra. Az ATCC 24229 törzs DNS plazmid mintázatának változása etidium-bromid gátló hatásának megszüntetése után. 46 (2); 32 (3); 27 (4); 21 (5); 8 (6); 4 (7); 0 (8) óra elteltével. 1. *Hind*III-emésztett λ DNS; 9. kontroll

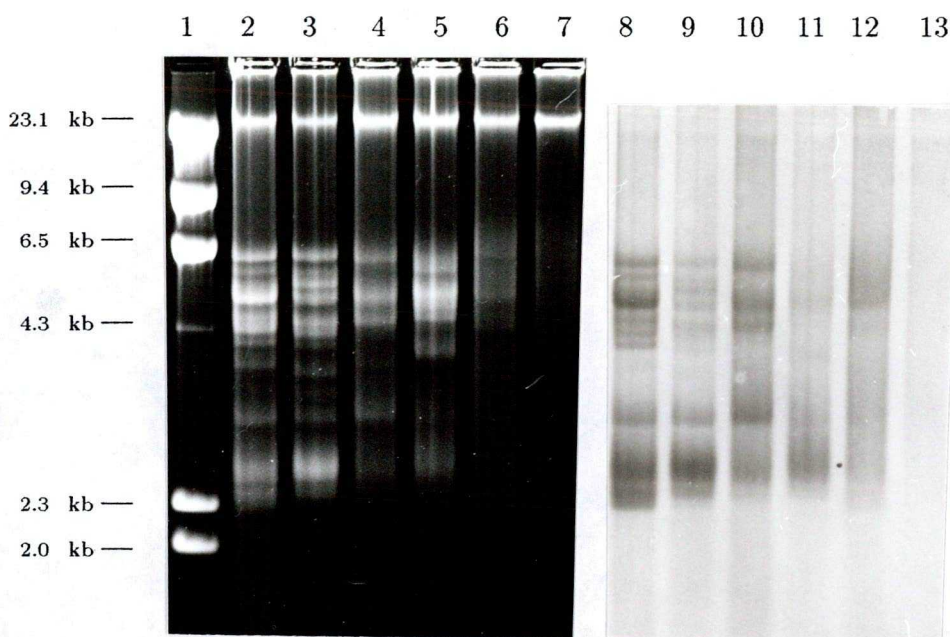
5.13 A DNS plazmidok sejten belüli elhelyezkedése

A plazmidok sejten belüli elhelyezkedésének meghatározásához mitokondriumokat izoláltunk az ATCC 24229 törzsből. A mitokondriumokat DNázissal kezeltük, a mitokondriumokon kívül elhelyezkedő DNS molekulák elbontására, majd CsCl gradiensen DNS-t tisztítottunk belőlük. Az így izolált DNS frakció valamennyi DNS

plazmidot tartalmazta.

5.14 Szekvencia homológia vizsgálat

Az ATCC 24269 törzsből származó 2 kb nagyságú plazmidot digoxigeninnel jelöltük és hibridizációs kísérletekben vizsgáltuk a plazmidok egymás közti homológiáját. Azt tapasztaltuk, hogy nem csak az azonos törzsön belüli plazmidok mutatnak homológiát egymással, hanem a különböző törzsek közöttiek is (23. ábra). Nem találtunk ugyanakkor szekvencia homológiát a *P. rhodozyma* és más gomba plazmidok között, így pl. a *K. lactis* lineáris DNS plazmidjai, valamint a *N. crassa kalilo* és a *S. cerevisiae* 2 μ -os plazmidjaival.



23. ábra. Szekvencia homológia a *P. rhodozyma* plazmidok között. 1. *Hind*III-emésztett λ DNS; 2. és 8. ATCC 24261; 3. és 9. ATCC 24229; 4. és 10. ATCC 24203; 5. és 11. CBS 6938; 6. és 12. CBS 5908; 7. és 13. CBS 5905

Folyamatban van a plazmidok restriktív fragmentjeinek klónozása és szekvencia analízise. Az ATCC 24229 törzs 4,3 kb plazmidjának 0,9 kb *Hind*III fragmentjét pKS

vektorba klónoztuk és szekvenciáját meghatároztuk. A szekvenciával számítógépes programok segítségével homológiákat keresünk különböző adatbázisokban. Eddig nem kaptunk értékelhető eredményt, fragmentünk nem mutatott homológiát az adatbázisban található egyetlen DNS szekvenciával sem.

6 Összefoglalás

Az eddigi munkánk során kapott eredmények azt bizonyítják, hogy a *Phaffia rhodozyma* — a bazidiomicéta élesztők körében ezidáig egyetlen — petite pozitív faj. A mitokondriumok oxigén fogyasztásának vizsgálata és a citokróm-oxidáz teszt azt igazolta, hogy az általunk izolált petite törzsekben a mitokondriumok nem funkcionálnak, tehát valódi petite mutánsoknak tekinthetők. Spontán kb. 1%-os gyakorisággal izolálhatók, de előfordulási gyakoriságuk etidium-bromid kezeléssel 74%-ra növelhető. Petite mutánsokat csak a CBS 5905 törzsből sikerült izolálnunk, a rendelkezésünkre álló további öt. törzsből nem.

A CBS 5905 törzs mitokondriális DNS-ét vizsgálva megállapítottuk, hogy annak úszó denzitása a magi DNS-ével azonos, így CsCl gradiensen nem választhatók el egymástól. A *Bal31* enzimmel történt emésztés a mtDNS lineáris felépítését bizonyította, nagysága megközelítőleg 13 kb, ami az ezidáig ismert legkisebb mtDNS méretnek felel meg. Hibridizációs kísérletekben a rendelkezésünkre álló *Candida parapsilosis* mitokondriális génpróbákkal homológiát mutatott. Az általunk eddig klónozott és szekvenált fragmentből származtatható aminosav sorrend fehérje adatbázissal történt összevetése során szekvencia homológiát mutatott citokróm c-oxidáz enzimekkel. Az enzimek réz-kötő helyein maximális homológiát kaptunk. A mtDNS pontos fizikai és funkcionális térképének elkészítéséhez a közel-jövőben további kísérleteket tervezünk.

A birtokunkban levő törzsek minilizátumait vizsgálva megállapítottuk, hogy nagy számú RNS és DNS plazmidot tartalmaznak. Enzimatisus kezelésekkel bizonyítottuk, hogy az RNS molekulák duplaszálúak. A vizsgált törzsek dsRNS mintázata különbözőnek bizonyult. Két törzs nem tartalmazott dsRNS-t, egy törzsben egy, egy további törzsben három, két törzsben pedig négy különböző méretű dsRNS

molekulát tudtunk kimutatni. Megállapítottuk, hogy a dsRNS-hordozó törzsekben megtalálható 3,7 kb méretű dsRNS molekula „csupasz”, míg a többi egy 24 x 36 nm-s vírusszerű partikulum genomját alkotja.

A vírus-hordozó törzsekben kiterjedt vizsgálatok ellenére sem tudtunk killer aktivitást kimutatni. Vírus-hordozó és vírus-mentes törzsek keresztezése révén sikerült olyan törzset előállítanunk, amely vírus-hordozó volt, ugyanakkor a vírus-mentes szülői törzs kromoszóma mintázatával rendelkezett. Összehasonlító kísérletekben vizsgáltuk ezen két törzs vegetatív szaporodását, konjugációs, sporulációs valamint rekombinációs gyakoriságát. A statisztikai elemzések nem mutattak szignifikáns eltérést a vegetatív szaporodásban és a konjugációs gyakoriságban. Mindazonáltal a sporulációs és rekombinációs gyakoriságra kapott eredmények nem értékelhetők egyértelműen, így ezek további vizsgálatokat igényelnek. A vírusok ivaros spórákon keresztül megvalósuló transzmisszióját követve azt tapasztaltuk, hogy más gomba fajokhoz hasonlóan a *P. rhodozyma* vírusok ilyen módon megvalósuló terjedése hatékony, gyakorlatilag 100%.

A CBS 5905 törzs kivételével a törzsek nagy számú DNS plazmidot tartalmaznak. A plazmidok mérete a 2,0–6,5 kb tartományba esik. Etidium-bromid kezeléssel a plazmidok hatékonyan törölhetők a sejtekből, azonban ezzel egyidejűleg a sejtek osztódása is gátlódik. Az etidium-bromid gátló hatása alól felszabadulva a sejtek visszanyerik osztódási képességüket és plazmid tartalmukat. A két jelenség közti összefüggésre ma még nem ismerjük a magyarázatot.

A plazmidok sejten belüli elhelyezkedésének megállapítására izolált mitokondriumokból DNáz kezelés után DNS-t tisztítottunk. Az így kapott DNS, esetünkben az összes plazmid DNS molekula a mitokondriumokon belül helyezkedik el.

Hibridizációs kísérletek során homológiát kerestünk a *P. rhodozyma* plazmidok között. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy nem csak az egy törzsön

belül elhelyezkedő plazmidok mutatnak homológiát egymással, hanem a különböző törzsek közöttiek is. Nem találtunk ugyanakkor homológiát *P. rhodozyma* és más gomba fajok DNS plazmidjai között. A folyamatban levő DNS szekvenálási kísérletek sem adtak értékelhető eredményt ezidáig.

Eddigi eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a *Phaffia rhodozyma* igen összetett extrakromozómális genetikai rendszerrel rendelkező élesztő gomba faj, mely még számos jelentős kutatási eredményt szolgáltathat.



7 Irodalomjegyzék

- ADRIO, J. L., VEIGA, M., CASQUEIRO, J., LÓPEZ, M., FERNÁNDEZ, C. (1993) Isolation of *Phaffia rhodozyma* auxotrophic mutants by enrichment methods. J. Gen. Appl. Microbiol. 39, 303—312.
- ADRIO, J. L., LÓPEZ, M., CASQUEIRO, J., FERNÁNDEZ, C. AND VEIGA, M. (1995) Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. Curr. Genet. 27, 447—450.
- AN, G. -H., BIELICH, J., AUERBACH, R., JOHNSON, E. A. (1991) Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. Bio/Technology 9, 70—73.
- BENDICH, A. J. (1993) Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. Curr. Genet. 24, 279—290.
- BERNARDI, G. (1982) The origins of replication of the mitochondrial genome of yeasts. TIBS 7, 404—408.
- BOEKE, J. D., SANDMEYER, S. B. (1991) Yeast transposable elements. In: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. (Szerk. : Broach, J. R. , Pringle, J. R. , Jones, E. W.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- BRAMLEY, P. M., MACKENZIE, A. (1992) Carotenoid biosynthesis and its regulation in fungi. In: Handbook of applied mycology (Szerk. : Arora, D. K. , Elander, R. P. , Mukerji, K. G.) Marcel Dekker, 377—444.
- BUCK, K. W. (1986) Fungal virology — an overview. In: Fungal Virology. (Szerk. : Buck, K. W.) CRC Press, Boca Raton Florida

- BULDER, C. G. E. A. (1964) Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 30, 1—9.
- CASTILLO, A., CIFUENTES, V. (1994) Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 26, 364—368.
- CHUN, S. B., CHIN, J. E., BAI, S., AN, G. -H. (1992) Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 221—226.
- CIRIACY, M. (1993) Function of the genetic material: Transposable elements in lower eukaryotes. *Progress in Botany* 54, 306—317.
- CLARK-WALKER, G. D. (1992) Evolution of mitochondrial genomes in fungi. *Int. Rev. Cyt.* 141, 89—127.
- CONG, Y. -S., YARROW, D., LI, Y. -Y., FUKUHARA, H. (1994) Linear DNA plasmids from *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii* and *Wingea robertsiae*. *Microbiology* 140, 1327—1335.
- COURT, D. A., GRIFFITH, A. J. F., KRAUS, S. R., RUSSELL, P. J., BERTRAND, H. (1991) A new senescence-inducing mitochondrial linear plasmid in field-isolated *Neurospora crassa* strains from India. *Curr. Genet.* 19, 129—137.
- COURT, D. A., BERTRAND, H. (1992) Genetic organization and structural features of *maranhar*, a senescence-inducing linear mitochondrial plasmid of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* 22, 385—397.
- DINOUEL, N., DRISSI, R., MIYAKAWA, N., SOR, F., ROUSSET, S. AND FUKUHARA, H. (1993) Linear mitochondrial DNAs of yeasts: closed-loop structure of the termini and possible linear-circular conversion mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2315—2323.

- EPHRUSSI, B., HOTTINGUER, H., CHIMENES, Y. (1949) Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur 76, 351.
- ESTEBAN, R., RODRIGUEZ-COUSINO, N., ESTEBAN, L. M. (1993) Genomic organization of T and W, a new family of double-stranded RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 46, 155—182.
- FINK, G. R., STYLES, C. A. (1972) Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2846—2849.
- FINKLER, A., BEN-ZVI, B. -S., KOLTIN, Y. (1988) dsRNA virus of *Rhizoctonia solani*. In: Viruses of fungi and simple eukaryotes. (Szerk. : Koltin, Y. , Leibowitz, M. J.) Marcel Dekker, Inc. New York and Basel 387—410.
- FOX, G. E., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R. B., GIBSON, J., MANILOFF, J., DYER, T. A., WOLFE, R. S., BALCH, W. E., TANNER, R. S., MAGRUM, L. J., ZABLEN, L. B., BLAKEMORE, R., GUPTA, R., BONEN, L., LEWIS, B. J., STAHL, D. A., LUEHRSEN, K. R., CHEN, K. N., WOESE, C. R. (1988) The phylogeny of prokaryotes. Science 209, 457—463.
- FUKUHARA, H., SOR, F., DRISSI, R., DINOUËL, N., MIYAKAWA, I. ROUSSET, S. AND VIOLA, A-M. (1993) Linear mitochondrial DNAs of yeasts: frequency of occurrence and general features. Mol. Cell. Biol. 13, 2309—2314.
- FUKUHARA, H. (1995) Linear DNA plasmids of yeasts. FEMS Microbiol. Lett. 131, 1—9.
- GESSNER-ULRICH, K., TUDZYNSKI, P. (1994) Studies on function and mobility of mitochondrial plasmids from *Claviceps purpurea*. Mycol. Res. 98, 511—515.
- GHABRIAL, S. A. (1988) Viruses of *Helminthosporium victoriae*. In: Viruses of fungi and simple eukaryotes. (Szerk. : Koltin, Y. , Leibowitz, M. J.) Marcel

- Dekker, Inc. New York and Basel 53—370.
- GIRARD, P., FALCONNIER, B., BRICOUT, J., VLADESCU, B. (1994) β -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 183—191.
- GOLUBEV, W. I. (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Yeast 11, 101—110.
- GOODWIN, G. H., DAHLBERG, A. E. (1982) Electrophoresis of nucleoproteins. In: Gel electrophoresis of nucleic acids. (Szerk. : Rickwood, D. , Hames, B. D.) IRL Press, Oxford Washington DC
- GRAY, M. W. (1989) The evolutionary origins of the organelles. TIG 5, 294—299.
- GRIFFITHS, A. J. F. (1992) Fungal senescence. Annu. Rev. Genet. 26, 351—372.
- GRIFFITHS, A. J. F. (1995) Natural plasmids of filamentous fungi. Microbiol. Rev. 59, 673—685.
- GROSSMAN, L. I. AND HUDSPETH, M. E. S. (1985) Fungal mitochondrial genomes. In: Gene manipulation in fungi 65—103.
- GUÉHO, E., KURTZMAN, C. P., PETERSON, S. W. (1989) Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S ribosomal RNA sequence divergence. System. Appl. Microbiol. 12, 230—236.
- GUNGE, N., TAMARU, A., OZAWA, F., SAKAGUCHI, K. (1981) Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. J. Bact. 145, 382—390.
- HAYAT, M. A. (1973) Basic electron microscopy techniques. Van Nostrand Reinhold Company, New York Toronto London Melbourne

- HERMANN, J., DEBETS, F., HOEKSTRA, R., OSIEWACZ, H. D. (1995) A novel family of linear plasmids with homology to plasmid pAL2-1 of *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 246, 638—647.
- HERMANN, J., ASSEBURG, A., OSIEWACZ, H. D. (1995) Evidence for giant linear plasmids in the ascomycete *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 27, 379—386.
- HERMANN, J., ASSEBURG, A., OSIEWACZ, H. D., (1994) Evidence for a life span-prolonging effect of a linear plasmid in a longevity mutant of *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 243, 297—307.
- HOLLINGS, M. (1962) Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* 196, 962.
- JOHNSON, E. A., AN, G. -H. (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotech.* 11, 297—326.
- KATAYOSE, Y., KAJIWARA, S., SHISHIDO, K. (1990) The basidiomycete *Lentinus edodes* linear mitochondrial DNA plasmid contains a segment exhibiting a high autonomously replicating sequence activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 18, 1395—1400.
- KAWANO, S., TAKANO, H. AND KUROIWA, T. (1995) Sexuality of mitochondria : fusion, recombination, and plasmids. *Int. Rev. Cyt.* 161, 49—110.
- KIKUCHI, Y., HIRAI, K., HISHINUMA, F. (1984) The yeast linear DNA killer plasmids, pGKL1 and pGKL2, possess terminally attached proteins. *Nucl. Acids Res.* 12, 5685—5692.
- KISTLER, H. C., LEONG, S. A. (1986) Linear plasmidlike DNA in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *J. Bact.* 167, 587—593.
- KITADA, K., HISHINUMA, F. (1987) A new linear DNA plasmid isolated from the

- yeast *Saccharomyces kluyveri*. Mol. Gen. Genet. 206, 377—381.
- KLEINSCHMIDT, W. J. (1988) Discovery of a mycovirus: an indirect route. In: Viruses of fungi and simple eukaryotes (Szerk. : Koltin, Y. és Leibowitz, M. J.) 1—14.
- KOLTIN, Y., DAY, P. R. (1976) Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 594—598.
- KOLTIN, Y., STEINLAUF, R. (1980) The killer phenomenon in *Ustilago*: Electron microscopy of the dsRNA encapsidated in individual virus particles. Arch. Microbiol. 128, 45—52.
- KOLTIN, Y., LEVINE, R., PEERY, T. (1980) Assignment of functions to segments of the dsRNA genome of the *Ustilago* virus. Molec. Gen. Genet. 178, 173—178.
- KOVALENKO, S. A., TANAKA, M., OZAWA, T. (1994) Simple methods for preparation of plasmid DNA yielding long and accurate sequence data. Nucl. Acid Res. 22, 5771—5772.
- KOZLOVA, T. M. (1973) Virus-like particles in yeast cells. Microbiologiya 42, 745—747.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (1984) The yeasts- a taxonomic study. Elsevier Science Publishers B. V. - Amsterdam.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (1987) Classification of yeasts. In: The yeasts volume 1 (Szerk. : Rose, A. H. and Harrison, J. S.) 5—55.
- KUCSERA, J., PFEIFFER, I., FERENCZY, L. (1995) Genetic demonstration of the sexual life cycle in the biotechnologically important yeast *Phaffia rhodozyma*. In: Abstract book of 17th ISSY, Yeast growth & differentiation: biotechnological, biochemical & genetic aspects, Edinburgh, UK

- LAMBOWITZ, A. M., BELFORT, M. (1993) Introns as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 587—622.
- LEMKE, P. A. (1979) Viruses and plasmids in fungi. (Szerk. : Lemke, P. A.) Marcel Dekker Inc. , New York and Basel
- LEWIS, M. J. (1990) *Phaffia rhodozyma*: a red yeast with potential as an animal feed. In: Proceedings of Alltech's Sixth Annual Symposium. (Szerk. : T. P. Lyons.) 391—405.
- LIM, L., HOWLETT, B. J. (1994) Linear plasmids, pLm9 and pLm 10, can be isolated from the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans* by pulse-field gel electrophoresis. *Curr. Genet.* 26, 276—280.
- LIVSHITS, M. A., AMOSOVA, O. A., LYUBCHENKO, YU. L. (1990) Flexibility difference between double-stranded RNA and DNA as revealed by gel electrophoresis. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 7, 1237—1249.
- LLOYD, D. (1974) The mitochondria of microorganisms. Academic Press, London New York San Francisco
- MARTIN, F. (1995) Linear mitochondrial genome organization in vivo the genus *Pythium*. *Curr. Genet.* 28, 225—234.
- MCCRACKEN, D. A., MARTIN, V. J., STARK, M. J. BOLEN, P. L. (1994) The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 140, 425—431.
- MCEWEN, J. E., CAMERON, V. L., POYTON, R. O. (1985) Rapid method for isolation and screening of cytochrome c oxidase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 161, 831—835.

- MEINHARDT, F., KEMPKEN, F., KMPER, J., ESSER, K. (1990) Linear plasmids among eukaryotes: fundamentals and application. *Curr. Genet.* 17, 8995.
- MILLER, M. W., YONEYAMA, M., SONEDA, M. (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 286—291.
- MOHAN, M., MEYER, R. J., ANDERSON, J. B., HORGAN, P. A. (1984) Plasmid-like DNAs in the commercially important mushroom genus *Agaricus*. *Curr. Genet.* 8, 615—619.
- MYERS, C. J., GRIFFITH, A. J. F., BERTRAND, B. (1989) Linear *kalilo* DNA is a *Neurospora* mitochondrial plasmid that integrates into the mitochondrial DNA. *Mol. Gen. Genet.* 220, 113—120.
- NAGY, Á., GARAMSZEGI, N., VÁGVÖLGYI, CS., FERENCZY, L. (1994) Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 123, 315—318.
- NAKASE, T., TAKEMATSU, A. AND YAMADA, Y. (1993) Molecular approaches to the taxonomy of ballistosporous yeasts based on the analysis of the partial nucleotide sequences of 18S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 39, 107—134.
- NELIS, H. J., DE LEENHEER, A. P. (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 181—191.
- NOSEK, J., FUKUHARA, H. (1994) NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts. *J. Bact.* 176, 5622—5630.
- NOSEK, J., DINOUL, N., KOVAC, L., FUKUHARA, H. (1995) Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. *Mol. Gen. Genet.* 247, 61—72.

- NUSS, D. L. (1992) Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 56, 561—576.
- OHNISHI, T. (1973) Mechanism of electron transport and energy conservation in the site 1 region of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* 301, 105—128.
- OLIVER, S. G., MCCREADY, S. J., HOLM, C., SUTHERLAND, P. A., MCLAUGHLIN, C. S., COX, B. S. (1977) Biochemical and physiological studies of the yeast virus-like particle. *J. Bact.* 130, 1303—1309.
- PALÁGYI, ZS., NAGY, Á., VÁGVÖLGYI, CS., FERENCZY, L. (1995) A new mutation protocol for obtaining auxotrophic mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotech. Tech.* 9, 401—402.
- PHILLISKIRK, G., YOUNG, T. W. (1975) The occurrence of killer character in yeast of various genera. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 41, 147—151.
- PISKUR, J. (1994) Inheritance of the yeast mitochondrial genome. *Plasmid* 31, 229—241.
- PON, L., SCHATZ, G. (1991) Biogenesis of yeast mitochondria. In: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces* (Szerk. : Broach, J. R. , Pringle, J. R. , Jones, E. W.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 333—406.
- QIN, H., WELKER, D. L., YOUSSEF, N. N. (1993) Isolation and characterization of a linear plasmid from the entomopathogenic fungus *Ascospaera apis*. *Plasmid.* 29, 19—30.
- RAYKO, E., GOURSOT, R. (1996) Amphimeric mitochondrial genomes of petite mutants of yeast. A model for the amplification of amphimeric mitochondrial petite DNA. *Curr. Genet.* 30, 135—144.

- REED, K. C., MANN, D. A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acids Res.* 13, 7207—7221.
- REKOSH, D. M. K., RUSSEL, W. C., BELLETT, A. J. D., ROBINSON, A. J. (1977) Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 11, 283—295.
- RICKWOOD, D., WILSON, M. T. 'ES DARLEY-USMAR, V. M. (1987) Isolation and characteristics of intact mitochondria. *Mitochondria — a practical approach* (Szerk. : Darley-USmar, V. M. , Rickwood, D. és Wilson, M. T.) 1—17.
- ROHE, M., SCHRÜNDER, J., TUDZYNSKI, P. AND MEINHARDT, F. (1992) Phylogenetic relationships of linear, protein-primed replicating genomes. *Curr. Genet.* 21, 173—176.
- SACCONE, C. (1994) The evolution of mitochondrial DNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 875—881.
- SALAS, M., MELLADO, R. P., VINUELA, E., SOGO, J. M. (1978) Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *J. Mol. Biol.* 119, 269—291.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHAFFRATH, R., SOOND, S. M., MEACOCK, P. A. (1995) The DNA and RNA polymerase genes of yeast plasmid pGKL2 are essential loci for plasmid integrity and maintenance. *Microbiology* 141, 2591—2599.
- SCHATZ, G., HASLBRUNNER, E., TUPPY, H. (1964) Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 127—132.

- SCHISLER L. C., SINDEN J. W., SIGEL E. M. (1963) Transmission of a virus disease of mushrooms by infected spores. *Phytopathology* 53, 888.
- SCHROEDER, W. A., JOHNSON, E. A. (1993) Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 907—912.
- SHEPHERD, H. S., LIGON, J. M., BOLEN, P. L., KURTZMAN, C. P. (1987) Cryptic DNA plasmids of the heterothallic yeast *Saccharomycopsis crataegensis*. *Curr. Genet.* 12, 297—304.
- SIEGEL, S., CASTELLAN, N. J. (1988) Nonparametric statistics. McGraw-Hill, Inc. Singapore
- STAM, J. C., KWAKMAN, J., MEIJER, M., STUITJE, A. R. (1986) Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of *Kluyveromyces lactis*: evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins. *Nucl. Acids Res.* 14, 6871—6884.
- STARK, M. J. R., BOYD, A., MILEHAM, A. J., ROMANOS, M. A. (1990) The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast* 6, 1—29.
- TRACY, R. L., 'ES STERN, D. B. (1995) Mitochondrial promoter structures and RNA polymerases. *Curr. Genet.* 28, 205—216.
- TUDZYNSKI, P., ESSER, K. (1986) Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea*. *Curr. Genet.* 10, 463—467.
- VARGA, J., VÁGVÖLGYI, Cs., NAGY, Á., PFEIFFER, I., FERENCZY, L. (1995) Isoenzyme, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma* Miller et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 173—177.

- VIERULA, P. J., CHENG, C. K., COURT, D. A., HUMPHREY, R. W., THOMAS, D. Y., BERTRAND, H. (1990) The *kalilo* senescence plasmid of *Neurospora intermedia* has covalently-linked 5' terminal proteins. *Curr. Genet.* 17, 195—201.
- WEIJMAN, A. C. M., RODRIGUES DE MIRANDA, L., VAN DER WALT, J. P. (1988a) Redefinition of *Candida* Berkhout and the consequent emendation of *Cryptococcus* Kützig and *Rhodotorula* Harrison. *Antonie van Leeuwenhoek* 54, 545—553.
- WEIJMAN, A. C. M., RODRIGUES DE MIRANDA, L. (1988b) Carbohydrate patterns of *Candida*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 54, 535—543.
- WICKNER, R. B. (1991) Yeast RNA virology: The killer systems. In: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces* (Szerk. : Broach, J. R. , Pringle, J. R. , Jones, E. W.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 263—296.
- WICKNER, R. B. (1993a) Double-stranded RNA virus replication and packaging. *J. Biol. Chem.* 268, 3797—3800.
- WICKNER, R. B. (1993b) Host control of yeast dsRNA virus propagation and expression. *TIM* 1, 294—299.
- WILBER, K. A., PROFFITT, J. H. (1987) Detection of linear plasmids in *Phaffia rhodozyma*. *UCLA Yeast Symp.* 106.
- WILLIAMSON, D. H., FENNELL, D. J. (1974) Apparent dispersive replication of yeast mitochondrial DNA as revealed by density labelling experiments. *Mol. Gen. Genet.* 131, 193—207.

WORSHAM, P. L., BOLEN, P. L. (1990) Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Curr. Genet.* 18, 77—80.

YAMADA, Y., NAGAHAMA, T., KAWASAKI, H., BANNO, I. (1990) The phylogenetic relationship of the genera *Phaffia* Miller, Yoneyama et Soneda and *Cryptococcus* Kützing emend. Phaff et Spencer (*Cryptococcaceae*) based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36, 403—414.

ZAR, J. H. (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey

8 Közlemények jegyzéke

Varga, J., Vágvölgyi, Cs., Nagy, Á., **Pfeiffer, I.**, Ferenczy, L. (1995) Isoenzyme, restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma* Miller et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 173—177.

Crabeel, M., de Rijcke, M., Seneca, S., Heimberg, H., **Pfeiffer, I.**, Matisova, A. (1995) Further definition of the sequence and position requirements of the arginine control element that mediates repression and induction by arginine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1367—1380.

Pfeiffer, I., Kucsera, J., Varga, J., Párducz, Á., Ferenczy, L. (1996) Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 30, 294—297.

Hamari, Zs., **Pfeiffer, I.**, Kevei, F., Ferenczy, L. (1996) Preparation of mitochondrial DNA from fungal protoplasts. (közlésre benyújtva, *J. Microbiol. Methods*)

Kucsera, J., **Pfeiffer, I.**, Ferenczy, L. (1996) Fusion of chemically inactivated *Saccharomyces* protoplasts (kézirat)

Előadások, poszterek

- Kevei, F., Varga, J., Vágvölgyi, Cs., Kucsera, J., Nagy, Á., **Pfeiffer, I.**, Ferenczy, L. (1994) Interpretation of compatibility relations among black *Aspergilli* on the basis of their molecular characters. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 41, 348.
- Kucsera, J., Csiha, J., Nagy, Á., **Pfeiffer, I.**, Ferenczy, L. (1994) Interspecific protoplast fusion of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kluyveri*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 41, 351.
- Pfeiffer, I.**, Kucsera, J., Ferenczy, L. (1994) Identification of double stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma* strains. *Fungal Genetics Newsletter* 41A, 82.
- Pfeiffer, I.**, Kucsera, J., Varga, J., Ferenczy, L. (1994) Regulatory effect of linear plasmids in *Phaffia rhodozyma*. In: Abstract book of IUMS 7th International Congress of Mycology Division, Prague, p364.
- Kucsera, J., **Pfeiffer, I.**, Ferenczy, L. (1995) Occurrence of petite mutation in *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 42, 134.
- Kucsera, J., **Pfeiffer, I.**, Ferenczy, L. (1995) Genetic demonstration of the sexual life cycle in the biotechnologically important yeast *Phaffia rhodozyma*. In: Abstract book of 17th ISSY, Yeast growth & differentiation: biotechnological, biochemical & genetic aspects, Edinburgh, UK
- Pfeiffer, I.**, Kucsera, J., Ferenczy, L. (1995) Characterization of DNA plasmids in *Phaffia rhodozyma*. In: Abstract book of 17th ISSY, Yeast growth & differentiation: biotechnological, biochemical & genetic aspects, Edinburgh, UK
- Pfeiffer, I.**, Kucsera, J., Varga, J., Ferenczy, L. (1996) Extrachromosomal genetic elements in *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 43, 229.

Kucsera, J., **Pfeiffer, I.**, Ferenczy, L. (1996) Basidiosporulation induction by nitrogen deprivation in *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). Acta Microbiol. Immunol. Hung. 43, 241.

Kucsera, J., **Pfeiffer, I.**, Ferenczy, L. (1996) *Phaffia rhodozyma* strain CBS 5905 is a petite-positive basidiomycetous yeast. In: Abstract book of IUMS 8th International Congress of Mycology Division, Jerusalem, Israel

Pfeiffer, I., Kucsera, J., Ferenczy, L. (1996) The effects of dsRNA viruses on the reproduction of *Phaffia rhodozyma*. In: Abstract book of IUMS 8th International Congress of Mycology Division, Jerusalem, Israel

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Ferenczy Lajos egyetemi tanárnak, hogy egyetemi tanulmányaim végeztével lehetővé tette számomra, hogy munkámat a JATE Mikrobiológiai Tanszékén folytathassam. Köszönöm továbbá a kutatási irányok kijelölésében és azok megvalósításában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Kucsera Juditnak azt az évek óta tartó szoros szakmai és baráti együttműködést, amelynek során hasznos tanácsaival segítette munkámat. Disszertációm anyaga közös munkánk eredménye.

Külön köszönet illeti velem egy laboratóriumban dolgozó munkatársaimat, Dr. Kevei Ferencet, Hamari Zsuzsannát és Tóth Beátát, azért a baráti, alkotó légkörért mellyel munkám elvégzéséhez nagyban hozzájárultak.

Köszönöm Kovácsné Deák Juditnak és Nagy Lajos Gergelynek munkám során nyújtott technikai segítségét.

Végezetül ezúton is szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik név szerint nem kerültek ugyan megemlítésre, de dolgozatom elkészítéséhez vezető munkámat figyelemmel kísérték, hasznos tanácsaikkal segítették.

