SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

BIOLÓGIA DOKTORI PROGRAM

TIPIZÁLÁSI MÓDSZEREK KIDOLGOZÁSA *CANDIDA* FAJOK ELKÜLÖNÍTÉSÉRE

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

KÉSZÍTETTE: FARKAS ZOLTÁN ISTVÁN

TÉMAVEZETŐ: DR. PFEIFFER ILONA

2010

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK **2**
RÖVIDÍTÉSEK **5**
TÖRZSGYŰJTEMÉNY KÓDOK **6**
1. BEVEZETÉS **7**
CÉLKITŰZÉSEK 8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS **9**
2. 1. A MITOKONDRIUM 9
2. 2. A MITOKONDRIUMOK EREDETE 9
2. 3. A MITOKONDRIÁLIS GENOM 10
2. 3. 1. A mitokondriális genom szerkezeti diverzitása *10*
2. 3. 2. Cirkuláris vs lineáris mitokondriális genom *12*
2. 3. 3. A mitokondriális végstruktúrák típusai *14*
2. 4. MITOKONDRIÁLIS INTRONOK VIZSGÁLATA 15
2. 5. A MITOKONDRIÁLIS GENOM VIZSGÁLATOK GYAKORLATI VONATKOZÁSAI 16
2. 6. A CANDIDA ALBICANS KLÁD 17
2. 6. 1. Candida maltosa *18*
2. 6. 2. C. parapsilosis *19*
2. 6. 3. C. albicans *20*
2. 6. 3. 1. *C. albicans* tipizálási módszerek 21
2. 6. 3. 2. EO3 régió vizsgálat 22
2.7. KILLER JELENSÉG 23
2. 7. 1. Előfordulás, ökológiai szerep *23*
2. 7. 2. Általános jellemzés *24*
2. 7. 3. Genetikai háttér *25*
2. 7. 3. 1. dsRNS víruson kódolt killer rendszerek 26
2. 7. 3. 2. Lineáris DNS plazmidok által kódolt killer tulajdonság 27
2. 7. 3. 3. Nukleáris gének által kódolt killer tulajdonság 28
2. 7. 4. Pichia anomala *29*
2. 7. 5. Killer toxinok alkalmazási lehetőségei *31*
2. 7. 5. 1. Ipari hasznosítása: élelmiszeripar és fermentációs folyamatok 31
2. 7. 5. 2. A killer toxinok, mint potenciális antifungális szerek 32
2. 7. 5. 3. Killer toxin expresszió transzgénikus növényekben 32
2. 7. 5. 4. Heterológ proteinszekréció 33
2. 7. 5. 5. Törzsazonosítás killer toxin érzékenység alapján 33
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK **34**
3. 1. FELHASZNÁLT TÖRZSEK 34
3. 1. 1. Candida albicans törzsek *34*
3. 1. 2. Candida parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis törzsek *34*
3. 1. 3. Intron analízishez felhasznált törzsek *35*
3. 1. 4. Toxin kísérletekhez használt törzsek *35*
3. 1. 5. Baktérium transzformációhoz használt törzsek *35*
3. 2. ALKALMAZOTT TÁPTALAJOK ÉS TÁPOLDATOK 36
3. 2. 1. Tenyésztéshez és törzs fenntartásra használt táptalajok, tápoldatok *36*
3. 2. 2. Toxintermelés körülményeinek optimalizálására használt tápoldatok *36*
3. 2. 3. Transzformációhoz használt táptalajok, tápoldatok *37*
3. 3. EGYÉB FELHASZNÁLT OLDATOK, REAGENSEK 37
3. 3. 1. Mitokondriális DNS izolálásához használt anyagok *37*
3. 3. 2. Totál DNS izolálásához használt anyagok *38*
3. 3. 3. Plazmid DNS izolálásához használt anyagok *38*
3. 3. 4. DNS könyvtár konstrukcióhoz használt anyagok *38*

3. 3. 5. Nukleinsav gélelektroforéziséhez használt oldatok: *39*
3. 3. 6. Fehérje analízishez használt anyagok *39*
3. 3. 6. 1. Fehérje tisztításhoz és koncentráláshoz használt szűrők 39
3. 3. 6. 2. Fehérje koncentráláshoz használt anyagok 40
3. 3. 6. 3. SDS PAGE-hez használt oldatok: 40
3. 3. 6. 4. Ezüst festéshez használt anyagok 41
3. 3. 6. 5. Natív gélelektroforézishez használt anyagok 41
3. 3. 6. 6. Oszlopkromatográfiához használt anyagok 41
3. 3. 6. 7. Áramlási citometriához használt anyagok 42
3. 3. 7. Protoplaszt képzéshez szükséges anyagok *42*
3. 3. 8. Kariotipizáláshoz (PFGE) használt oldatok *42*
3. 3. 9. Enzimek *43*
3. 3. 9. 1. Restrikciós endonukleázok (Fermentas) 43
3. 3. 10. DNS jelöléshez használt anyagok *43*
3. 3. 11. Southern-blot *44*
3. 3. 12. DNS hibridizációhoz használt oldatok, reagensek *44*
3. 3. 13. Ligáláshoz használt reagensek *44*
3. 3. 14. Transzformációhoz használt anyagok *45*
3. 3. 15. Elektroporáláshoz használt anyagok *45*
3. 3. 16. PCR reakcióhoz szükséges reagensek, primerek *45*
3. 4. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK 47
3. 4. 1. Tenyésztési körülmények *47*
3. 4. 2. Totál DNS izolálás *47*
3. 4. 3. Mitokondriális DNS izolálása (Láday és mtsi, 2001) *47*
3. 4. 4. Agaróz gélelektroforézis *48*
3. 4. 5. mtDNS RFLP totál DNS-ből *48*
3. 4. 6. Izolált mtDNS enzimes kezelése *49*
3. 4. 7. Restrikciós térképek készítése Hamari és mtsi (1999) alapján *49*
3. 4. 8. Protoplaszt készítés (Kucsera és Ferenczy, 1986) *50*
3. 4. 9. Pulzáltatott mezejű gélelektroforézis (PFGE) *50*
3. 4. 10. Southern blot *50*
3. 4. 11. DNS izolálás gélből *51*
3. 4. 12. DNS jelölés digoxigeninnel *51*
3. 4. 13. DNS hibridizáció *52*
3. 4. 14. Kompetens sejtek készítése *52*
3. 4. 15. Elektrokompetens sejtek készítése *53*
3. 4. 16. Ligálás, transzformáció *53*
3. 4. 17. Plazmid preparálás E. coli-ból *53*
3. 4. 18. Polimeráz láncreakció (PCR) *54*
3. 4. 19. DNS-szekvenálás *54*
3. 4. 20. DNS könyvtár konstrukció *54*
3. 4. 21. Intron analízis *55*
3. 4. 22. Pichia anomala killer toxin vizsgálata *55*
3. 4. 22. 1. Toxintartalmú fermentlé előállítása 55
3. 4. 22. 2. Érzékeny törzsek tenyésztése 56
3. 4. 22. 3. Élesztő-élesztőgomba antagonizmus vizsgálata 56
3. 4. 22. 4. Toxin stabilitásának vizsgálata 56
3. 4. 22. 4. 1. Hőmérséklet-optimum meghatározása 56
3. 4. 22. 4. 2. pH-optimum meghatározása 56
3. 4. 22. 4. 3. Enzimes kezelés 56
3. 4. 22. 5. Élőcsíraszám meghatározás 56
3. 4. 22. 5. 1. Csészés módszer 56
3. 4. 22. 5. 1. Áramlási citometriás mérések 57
3. 4. 22. 6. Sejtfalkomponens affinitás vizsgálat 57
3. 4. 22. 7. Toxinok protoplasztokra gyakorolt hatása 57
3. 4. 22. 8. Toxin azonosítása, tisztítása 58
3. 4. 22. 8. 1. Toxin méretének meghatározása 58
3. 4. 22. 8. 2. Fehérje koncentrálási eljárások 58
3. 4. 22. 8. 3. SDS gélelektroforézis 58
3. 4. 22. 8. 4. Natív gélelektroforézis (Kevei és mtsi, 1999) 58
3. 4. 22. 8. 5. Ioncserés kromatográfia (IEC, Bonnerjera és mtsi, 1986) 59

3. 4. 22. 8. 6. Affinitás kromatográfia (Hutchins és Bussey, 1983) 59
3. 4. 22. 7. 7. Toxint nem termelő mutánsok előállítása UV mutagenezissel 60

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 61

4. 1. CANDIDA ALBICANS KLINIKAI IZOLÁTUMOK VIZSGÁLATA 61
4. 1. 1. C. albicans klinikai izolátumok mtDNS polimorfizmus vizsgálata 61
4. 1. 2. C. albicans klinikai izolátumok fizikai térképezése 66
4. 1. 3. C. albicans klinikai izolátumok differenciálása 67
4. 1. 4. A mtDNS típusok parciális géntérképének elkészítése 69
4. 1. 5. Pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE) 70
4. 2. C. PARAPSILOSIS KLINIKAI IZOLÁTUMOK VIZSGÁLATA 71
4. 3. CANDIDA MALTOSA CBS 5611 TÖRZS MTDNS RESTRIKCIÓS ELEMZÉSE, TÉRKÉPEZÉSE 72
4. 4. MITOKONDRIÁLIS INTRONOK VIZSGÁLATA 73
4.5. PICHIA ANOMALA VKM Y-159 TÖRZS ÁLTAL TERMELT KILLER TOXIN JELLEMZÉSE 75
4. 5. 1. Hatásspektrum-vizsgálat 76
4. 5. 2. A termeltetés optimális körülményeinek meghatározása 76
4. 5. 3. Toxin biokémiai természetének meghatározása 78
4. 5. 3. 1. Toxin aktivitásának pH- és hőmérsékletoptimuma 78
4. 5. 3. 2. Enzimes kezelés hatása a toxin aktivitására 80
4. 5. 4. A toxin hatásmechanizmusának vizsgálata 81
4. 5. 5. Sejtfalkomponens affinitás vizsgálat 82
4. 5. 6. A killer aktivitás genetikai hátterének vizsgálata 84
4. 5. 7. Fehérje analízis 85

5. ÖSSZEFOGLALÁS 92

6. SUMMARY 96

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 100

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK 101

9. MELLÉKLETEK 117

Rövidítések

A	adenozin
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom - szerzett immunhiányos tünetegyüttes
APS	ammónium perszulfát
ATP	adenozin trifoszfát
bp	bázispár
C	citidin
CHEF	contour-clamped homogeneous electric field
CM	carboxymethyl (Sepharose)
cox	citokróm oxidáz
cyt b=cob	apocitkróm b alegység
DEAE	diethylaminoethyl (Sepharose)
DIG	digoxigenin
dNTP	dezoxi-nukleozid trifoszfát
dsRNS	double stranded (duplaszálú) RNS
DST	diploid sequence type
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav dinátrium sója
ER	endoplazmatikus retikulum
FAOD	fatty alcohol oxidase
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
G	guanozin
IEC	ioncserés kromatográfia
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
Kb	kilobázis
kDa	kilodalton
kDNS	kinetoplaszt DNS
kex	killer of expression
KHR	killer of heat resistant
KHS	killer of heat susceptible
KRE	killer of resistance
KSP	killer sensitvity pattern - killer szenzitivitás mintázat
lrRNS	nagy riboszómás RNS alegység
MAT	mating type locus-t kódoló gén
Mb	megabázis
MLEE	multilocus enzim elektroforézis
MLP	microsatellite length polymorphism
MLST	multilocus sequence typing
mtDNS	mitokondriális DNS
mtTBP	mitokondriális telomer binding (kötő) protein
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid redukált formája
NADPH-P450	NADPH-citokróm P450 reduktáz (elektron donor protein)
GN toxin	*Candida norvegica* és *C. guilliermondii* ellenes *Pichia anomala* toxin
N toxin	kizárólag *Candida norvegica* ellenes *Pichia anomala* toxin
ORF	open reading frame – nyílt leolvasási keret
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis

PCI	fenol-kloroform-izoamil-alkohol elegy
PCR	polimerase chain reaction – polimeráz láncreakció
PER	ammónium-perszulfát/ ammónium peroxodiszulfát
PFGE	pulsed field gel electrophoresis - pulzáltatott mezejű gélelektroforézis
PSK	pBluescript SK vektor
RAPD	random amplification of polymorphic DNA - random amplifikált polimorfikus DNS
RFLP	restriction fragment lenght polymorphism - restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
RT	reverz transzkriptáz
SCP	single cell protein/egysejt fehérje
SDS	nátrium dodecil szulfát
SMK	salt-mediated toxin – só mediált toxin
SOD	szuperoxid dizmutáz
srRNS	kis (small) riboszómás RNS alegység
T	timidin
TCA	triklór-ecetsav
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
TIR	terminal inverted repeat
t-loop	telomer loop
Tm	melting point – olvadási hőmérséklet
Tris	trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
tRNS	transzfer RNS
UCS	upstream consensus sequence
URF	unassigned reading frame
UV	ultraviola fény
VLP	virus-like particle – vírusszerű partikulumok
VMM	vitaminos minimál táptalaj
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside

Törzsgyűjtemény kódok

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia
VKM	All-Russian Collection of Microorganisms, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Oroszország

1. Bevezetés

Napjainkban a *Candida* fertőzések száma világszerte növekszik, a nozokomiális fertőzéseket okozó mikroorganizmusok közül a *Candida* nemzetség tagjai a negyedik helyet foglalják el (Richards és mtsi, 2000). Az Asconycota élesztők *Saccharomycetales* rendjének *Candida albicans* kládja főként opportunista humán patogén gombákat foglal magába (Diezmann és mtsi, 2004). A felszíni és szisztémás *Candida albicans* fertőzések száma az elmúlt évtizedek során (Bassetti és mtsi, 2006, Safdar és mtsi, 2002) egyre nő az antibakteriális antibiotikumok széleskörű alkalmazása és az immunkomprimált betegek növekvő száma miatt (Nosek, 2002, Deák, 2004). Habár a *C. albicans* a normál humán flóra tagja, ennek ellenére opportunista patogénként a gombás fertőzések esetén leggyakrabban izolálható fajról beszélünk (Bassetti és mtsi, 2007), mely legyengült immunrendszerrel bíró betegek esetén okoz fertőzést, immunkompetensekben az élesztő jelenléte jóindulatú. A felszíni fertőzések mellett (candidiázis, orofaringeális candidiázis és vulvovaginitisz), a *C. albicans* súlyos fertőzéseket képes okozni, mint például a candidemia és disszeminált candidiázis, melyek magas mortalitással asszociáltak. A humán fertőzések 45-60%-áért a *C. albicans* a felelős, míg Magyarországon ez az adat 77-80% (Dóczi és mtsi, 2002).

A mitokondriális genommal kapcsolatos eddigi eredmények főleg Ascomycota élesztőgombákhoz kötődnek. Ezen belül a *Candida* nemzetségbe tartozó fajok mtDNS-e egy igen intenzíven tanulmányozott terület. A mitokondriális genom-vizsgálatok számos faj genetikai rokonsági fokára deríthetnek fényt. A *C. albicans* populáció genetikai diverzitásáról szerzett információk megelőző eljárások kidolgozásában segíthetnek. A tipizálási módszerek nagy többsége kromoszómális DNS-en alapul, ilyenek a random amplifikált polimorfikus DNS (RAPD) analízis, az elektoforetikus kariotipizálás és a multilocus sequence typing. Egy alternatívát jelent az extrakromoszómális, mitokondriális DNS analízis, mellyel *C. albicans* esetén sikeresen lehet intraspecifikus genetikai variabilitást detektálni. A *C. albicans* mtDNS szerveződésére jellemző a cirkuláris konformáció, mérete a génbankban található SC 5314 törzs esetén 40420 bp (génbank hozzáférési szám: AF285261). Egy meglévő epidemiológiai jelentőséggel bíró módszer az EO3 tipizálás, aminek alapja a mitokondriális DNS duplikált régiójában található faj-specifikus régió, az EO3 régió polimorfizmus-vizsgálata.

Célkitűzések

Munkám során klinikai *C. albicans* izolátumok polimorfizmusát vizsgáltam és hasonlítottam össze törzsgyűjteményes *C. albicans* törzsekkel. Célul tűztük ki új tipizálási módszerek megalapozását, majd azok összehasonlítását már meglévő módszerekkel. A módszerek kidolgozásához célül tűztük ki az izolátumok mtDNS-ének fizikai és funkcionális térképezését, valamint olyan mtDNS régiók meghatározását, melyek PCR (polimeráz lánc reakció) illetve RFLP (restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus) metódusok alapjait szolgálhatják a későbbiekben.

PhD munkám másik felét egy, különböző *Candida* fajok ellen aktív toxint termelő killer élesztő, a *Pichia anomala* VKM Y-159 törzs karakterizálása képezte. Célunk volt a toxintermelés optimalizálása, a toxin(ok) jellemzése, hatásspektrum, hatásmechanizmus, receptor hely, biokémiai sajátosságok leírása.

2. Irodalmi áttekintés

2. 1. A mitokondrium

A mitokondriumok saját genetikai és fehérjeszintetizáló apparátussal rendelkező, emellett azonban jelentős sejtmagi szabályozás alatt álló szemiautonom sejtorganellumok, melyeket a citoplazmától kettős membrán választ el. Számuk sejttípusonként és fajonként eltérő, átlagosan 1000-2000 darab sejtenként. Fő funkciójuk az ATP szintézis, így jelenlétük esszenciális a magasabbrendű élőlények életműködése szempontjából (Burger és mtsi, 2003, Lang és mtsi, 1999). A mitokondrium külső membránja a mátrixot választja el a citoplazmától, míg a belső krisztákat képez, melyek a sejtlégzés utolsó lépcsőjének, az elektrontranszfer láncnak a helyét képezik (Sherratt, 1991). Ez az aerob folyamat 32 ATP-t generál, ellentétben az anaerob respirációval, ami csak 2 ATP-t eredményez (Pfeiffer mtsi, 2001). Az elektrontranszport lánc legtöbb komponense magi kódolású.

Az energia-transzdukcióban betöltött esszenciális szerepe mellett a mitokondrium számos más funkcióért is felelős a sejten belül. Aktívan részt vesz a sejt ion-homeosztázisának fenntartásában, az intermedier anyagcsere szabályozásában, valamint az apoptózis folyamatában. A mitokondrium saját transzkripciós és transzlációs apparátussal rendelkezik. A mitokondriális genom ún. maradvány genom, így csökevényes voltából adódóan számos, a mitokondriális funkciókban résztvevő gént sejtmagi DNS kódol, ezáltal a mitokondriális fehérjék döntő többsége a citoplazmában termelődik, majd később importálódik a mitokondriumba (Burger, 2003; Lang, 1999).

A látszólag mitokondrium nélkül működő eukarióta élőlények is rendelkeznek ún. hidrogenoszómával, származtatott mitokondriummal, ami a mitokondrium funkcióját anaerob körülmények közt is képes betölteni (Embley és mtsi, 2003).

2. 2. A mitokondriumok eredete

A mitokondriumok eredetére vonatkozó elméletek közül napjainkban a Gray-féle endoszimbionita elmélet a legelfogadottabb. A hipotézis szerint ezen organellumok primitív anaeob eukarióta sejtekkel szimbiózist alkotó aerob baktérium-ősöktől származnak, melyek legközelebbi ma élő rokonait az α-proteobaktériumok (pl: *Rickettsia prowazekii, Bradyrhizobium sp., Rhodospirillum sp.*) között találjuk meg (Burger és mtsi, 2003). A szimbiózis révén létrejött közös genomból a koevolúció során a sejtmag irányába megindult intenzív génáramlás

eredményeképpen alakult ki a redukált mitokondriális genom. Az elmélet mellett szól, hogy a mitokondriális DNS (mtDNS) hiszton nélküli, magmembránnal nem határolt (bakteriális típusú), a mitokondriális riboszómák antibiotikum érzékenysége (kloramfenikol, eritromicin) megegyezik a bakteriális riboszómákéval, valamint, hogy a légzésben szerepet játszó speciális enzimek mitokondriumokban és baktériumokban egyaránt megtalálhatók. A hipotézist alátámasztja még a kb. 2 μm-es méret, ami épp egy baktérium méretének felel meg.

2. 3. A mitokondriális genom

Az organellum genomja funkcionálisan konzervatív, minden élőlényben hasonló információtartalommal rendelkezik, azonban a genom mérete és strukturáltsága taxononként jelentős eltérést mutat (Burger és mtsi, 2003; Lang és mtsi, 1999; Nosek és Tomaska, 2003). Az AT gazdag mtDNS-en kódolt fehérjék legfeljebb ötféle mitokondriális folyamatban vesznek részt: respiráció és/vagy oxidatív foszforiláció, transzkripció, transzláció, RNS érés és protein import. A standard mitokondriális génkészlet a következőkből áll: a citokróm b-t (*cyt b*), a citokróm oxidáz (*cox*) 1-3 alegységét, az ATPáz komplex 6, 8, 9 alegységét illetve a NADH dehidrogenáz 7 alegységét, a kis és nagy riboszómális RNS (*srRNS* és *lrRNS*) kódoló gén, valamint fajtól függően 23-25 transzfer RNS (tRNS) gén. Kimutatták továbbá számos URF (unassigned reading frame) és ORF (open reading frame) régió jelenlétét is, melyek egy része az intron mozgásban játszik szerepet, viszont többségük funkciója egyelőre ismeretlen (Burger és mtsi, 2003; Lang és mtsi, 1999; Nosek és Tomaska, 2003). Néhány élesztőben a NADH dehidrogenáz gének nem találhatóak meg, ilyenek a *Saccharomyces cerevisiae* (Piškur és mtsi, 1998)*, Schizosaccharomyces pombe, Candida glabrata* (Koszul és mtsi, 2003) valamint a *Kluyveromyces lactis* (Zivanovic és mtsi, 2005), viszont megtalálható a *var1* gén, mely a riboszómális alegységek összeszereléséért felelős fehérjét kódol. A mitokondriumban a mtDNS molekulák kis csoportokba (nukleoid vagy kondriolit) rendeződve találhatóak, ezek mérete és száma (akár több ezer) a fiziológiás körülményekhez képest változó (Moraes, 2001). A nukleoidok a mtDNS és számos protein interakciójából jönnek létre (Kuroiwa, 1982).

2. 3. 1. A mitokondriális genom szerkezeti diverzitása

Az élőlények egyes csoportjaiban határozott különbségeket lehet megfigyelni a mitokondriális genom méretében, mely 6-2000 kb közé eshet. Állatokban 16-19 kb,

Protozoákban 22-40 kb, magasabbrendű növényekben 150-2000 kb, gombákban pedig 17-100 kb tartományba esik a mérete. A gombákon belül az élesztőgombák esetén 17,3 -101,1 kb a jellemző mérettartomány. A legnagyobb mtDNS méretet (akár 2500 kb) a tökfélék közt találjuk. A legkisebb genom mérete a parazita *Plasmodium* fajnak van, amely alig éri el a 6 kb-t és mindösszesen csak két gént kódol (Burger és mtsi, 2003; Lang és mtsi, 1999). A méretbeli különbségek számos folyamat eredményeképpen jöttek létre, egy részüket az AT gazdag intergénikus régiók méretének és szerveződésének jelentős különbségei okozzák. Számos fajban kiterjedt tandem ismétlődések, hurok-motívumok, különböző hosszúságú (0,1-4 kb) és számú (0-30 felett) intronok találhatóak (egy extrém példa a *Podospora anserina* fonalas gomba, mely mitokondriális genomjának 75%-át intronok alkotják, Cummings és mtsi, 1990; Burger és mtsi, 2003). A *Cucurbitaceae* család egyes tagjaiban a tandem ismétlődések felhalmozása okozza a 2500 kb méretet is meghaladó mitokondriális DNS-t (Burger és mtsi, 2003). A mobilis genetikai elemek mitokondriális és magi DNS közti cseréjét szekvencia-összehasonlítások alapján bizonyították, míg a horizontális géntranszfert távoli rokon fajok homológ génjeinek azonos pozícióban lévő hasonló intronjainak jelenléte alapján feltételezik. Egyes esetekben megfigyelték kódoló régiók mitokondriális genomok közti transzferét, melynek eredményeként hibrid gének jöttek létre (Burger és mtsi, 2003).

A mtDNS-en a gének organizációja igen változatos lehet. Az egyik forma a génfúzió, pl: két *Amoebozoa* egysejtűben a *cox1* és *cox2* gén azonos transzkripciós orientációban, közvetlenül egymás mellett helyezkedik el, így folytonos ORF-et alkotnak (Burger és mtsi, 2003, Lang és mtsi, 1999). Egy másik forma a géntörés. *Tetrahymena pyriformis* és *Chlamydomonas reinhardtii* esetében a mt rRNS génjei akár 8 modulba is törhetnek (Boer és Gray, 1988; Burger és mtsi, 2003; Lang és mtsi, 1999), melyek később elkeverednek a genomban, majd önálló transzkripció révén egyedi rRNS darabok jönnek létre, melyeket bázispárosodás és a komplementer szekvencia-szakaszok tartanak együtt. Két csillós faj (*Paramecium aurelia, Tetrahymena pyriformis) nad1* génje két fragmentumra törik, melyek két különböző mRNS-be íródnak át, így valószínűleg két külön polipeptid képződését eredményezik, melyek a transzlációt követően fúzionálnak (Edqvist és mtsi, 2000). *Scenedesmus obliquus* (Nedelcu és mtsi, 2000) mitokondriális citokróm-oxidázának 2. alegységét feltehetőleg 2 géndarab kódolja, melyek N-terminális régiója a mtDNS-ben, C-terminálisa pedig a nukleáris genomban helyezkedik el. A mitokondriális genom szokatlan jelenségei között meg kell említenünk a génrövidülést is.

Számos nem rokon állatfaj mtDNS-ében találtak csonka tRNS-t, melynek egy vagy több helikális karja hiányzott, például több állatnál (Boore, 1999) és Protistáknál (Gray és mtsi, 1998) is.

A mtDNS méretének redukciója a sejtmagba történő transzfer eredménye. A mitokondriális genom méretcsökkenésének egyéb okai lehetnek még az intronvesztés, intergénikus szakaszok eliminálása, amely folyamatok olyan mértékűek is lehetnek, hogy szélsőséges esetekben az egymással határos gének kódoló szekvenciái át is fedhetnek (Burger és mtsi, 2003). A nukleáris és mitokondriális genom sajátságait összehasonlítva, jelentős különbségeket tapasztalhatunk. A humán mtDNS szorosan összerendezett, kis számú intergenikus régiót tartalmaz, a sejtmagi gének pedig nagyszámú intront tartalmaznak (Anderson és mtsi, 1981; Lander és mtsi, 2001; Venter és mtsi, 2001). Ezzel szemben élesztőgombák mtDNS-e jóval nagyobb méretű, intronokban valamint intergénikus régiókban sokkal gazdagabb, nukleáris DNS-ükben viszont a gének szorosan egymás mellett helyezkednek el, a legtöbb esetben intronokat nem tartalmaznak (Foury és mtsi, 1998; Giaever és mtsi, 2002).

Az állati mtDNS kis méretű (15–20 kbp) cirkuláris molekula, mely 37 vagy kevesebb szorosan összerendezett gént tartalmaz. A monomer genom mellett gyakori az unicirkuláris dimer (két genom fej-farok kapcsolódása) és katenáták (két vagy több monomer cirkulum egymásba kapcsolódva láncszemszerűen, Boore, 1999; Clayton, 2000). Szokatlan DNS struktúra jellemzi a kinetoplasztid protozoa-k mt vagy kinetoplaszt DNS-ét (kDNS), mely több ezer egymásba kapcsolódó cirkulumból áll. A hálózat kétféle molekulából áll: minicirkulum (0,5–10 kb, $5x10^4$-10^5 db/hálózat) és maxicirkulum (20–40 kbp, 20-50 db/hálózat). A minicirkulumok szekvenciájának 10%-a konzervált, míg a maxicirkulumok szekvenciája teljesen homogén egy sejten belül, és a mt struktúrgéneket hordozza. A minicirkulumok szerepe a guide RNS-ek kódolása, amik az RNS editing-ben játszanak szerepet.(Simpson, 1987; Chen és mtsi, 1995; Lukes és mtsi, 2002).

2. 3. 2. Cirkuláris vs lineáris mitokondriális genom

A mitokondriális genomot kezdetben elektronmikroszkópos vizsgálatokkal tanulmányozták (Nosek és mtsi, 1998). Ezen módszerrel nyert adatok a mitokondriális DNS cirkuláris szerkezetét igazolták. Bár jóllehet némely esetben az elektronmikroszkópos képen lineáris szerkezet tűnt elő, ezt az eredményt elvetették, a minta előkészítése során keletkezett DNS törésnek, műterméknek gondolták. A kilencvenes évekig főleg ezen módszerrel

tanulmányozták a mitokondriális genom szerkezetét, ám egyre több organizmusnál figyeltek meg lineáris formákat (*Tetrahymena pyriformis*- Suyama és Miura, 1968; *Paramecium aurelia,* Goddard és Cummings, 1975; *Chlamydomonas reinhardtii,* Ryan és mtsi, 1978; *Williopsis (Hansenula) mrakii,* Wésolowski és Fukuhara, 1981; *C. parapsilosis,* Kovac és mtsi, 1984). A mtDNS lineáris voltát restrikciós térképezéssel, végjelöléssel, exonukleáz-emésztéssel, valamint elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is igazolhatjuk. A lineáris és cirkuláris molekulákat pulzáltatott mezejű gélelektroforézissel (PFGE) különíthetjük el hatékonyan egymástól (Nosek és mtsi, 1998). A cirkuláris térképezésű mitokondriális genommal rendelkező organizmusokban a cirkuláris molekulák kis arányban vannak jelen, jóval nagyobb részben különböző méretű, polidiszperz lineáris molekulák vannak (Bendich 1993; Backert és mtsi, 1997; Williamson, 2002), melyek általában nagyobbak a genom egységnél, és nincsenek speciális végstruktúráik, rolling-circle és/vagy rekombináció-függő replikációs stratégiákkal keletkeznek. A valódi cirkuláris genomok (állatok) Cairns-típusú theta struktúrával replikálódnak. A valódi lineáris molekulák a következő kritériumoknak kell megfelelniük: (i) restrikciós endonuklázos kezelést követően keletkeznek olyan fragmentumok, melyek csak lineáris molekula végére helyezhetők; (ii) végjelölést és exonukleázos emésztést lehet végrehajtani rajtuk; (iii) speciális végstruktúrával, a telomerrel rendelkeznek (Morin és Cech, 1988).

A lineáris mtDNS jellemzője a génsorrend szigorú konzervációja (még egyedi tRNS szinten is), míg a cirkuláris genom esetén variábilis a sorrend. Nosek és munkatársai kimutatták, hogy a lineáris és a cirkuláris mt genom replikációs mechanizumusa ugyanazokat a protein komponenseket használja fel (Nosek és mtsi, 1999; Tomaska és mtsi, 2001). Egy faj két külön törzse (pl: *Williopsis suaveolens, C. parapsilosis*) tartalmazhat lineáris és cirkuláris mtDNS-t is. Arra nézve, hogy a linearitás és a terminális struktúrák megléte jelent-e valami előnyt, még folynak kísérletek, de Kosa és munkatársai 2006-ban leírták, hogy a *C. metapsilosis* két törzse közül a lineáris mtDNS-sel rendelkező YPD médiumban túlnőtte a cirkuláris genommal rendelkezőt. A két konformáció intrakonverziója valószínűleg relatíve egyszerű mechanizmusok útján következhet be, egyik lehetőség a mitokondriális telomerek evolúciója, melyek fordított terminális ismétlődésekkel rendelkező mobilis genetikai elemekből (transzpozonok vagy plazmidok) származhatnak. Ezek az elemek a cirkuláris vagy polidiszperz lineáris mtDNS-be integrálódva lineáris genomot hoztak létre (Nosek és mtsi, 2003). A cirkulárisból lineáris szerkezetűvé való átmenetet filogenetikailag közeli fajok esetén is megfigyelhetjük. Ilyen jelenség figyelhető meg a *C. albicans* klád rokon fajai körében is, ahol *C. albicans* törzsekben

cirkuláris, *C. parapsilosis* törzsekben lineáris, míg *C. orthopsilosis* törzsekben cirkuláris és lineáris formát is megfigyelhetünk (Nosek és mtsi, 1998, 2003, 2004; Kosa és mtsi, 2006). Egy másik lehetséges mechanizmus a lineáris genom kialakulására telomer modulok horizontális transzfere. Ilyenek a *C. parapsilosis, C. salmanticensis* és *Pichia philodendri* esetén előforduló extragenomikus telomer minicirkulumok (Tomaska és mtsi, 2000), melyek rolling-circle mechanizmussal replikálódnak, és egy ősi mitokondriális genomba rekombinálódva hozhatták létre a lineáris genomot telomer szekvenciával. Feltételezhető egy enzim, mely a cirkuláris molekulában vagy konkatamerekben egy adott régiót felismerve hasít, így lineáris molekulákat hoz létre végstruktúrákkal (Nosek és mtsi, 2003). Lineárisból cirkuláris genom a telomer szekvenciában bekövetkező mutáció folyamán alakulhat ki (Fukuhara és mtsi, 1993).

2. 3. 3. A mitokondriális végstruktúrák típusai

A lineáris mtDNS-nek ugyanúgy, mint a magi kromoszómáknak, meg kell oldaniuk a végek replikáció során bekövetkező rövidülésének problémáját, illetve a végeket meg kell óvniuk a DNázok támadásaitól. A mitokondriális telomer struktúrák többféle típusát írták le eddig: (i) kovalensen kapcsolt egyszálú hairpin az egyik vagy mindkét végen (pl.: *Paramaecium aurelia, Pichia pijperii, W. mrakii*; Goddard és Cummings 1975; Pritchard és Cummings 1981; Dinouel és mtsi, 1993); (ii) változó számú tandem repeat egységek (pl: *Tetrahymena thermophila, C. parapsilosis*; Morin és Cech 1986, 1988; Nosek és mtsi, 1995), melyek a homológ rekombináció kiindulópontjaként, vagy a replikáció során az RNS primer kötőhelyéül szolgálhatnak; (iii) inverted terminális repeat-ek, 3’ egyszálú túlnyúló véggel (pl: *Chlamydomonas reinhardtii*; Vahrenholz és mtsi, 1993), mely nem engedi a recirkularizációt; (iv) 5’ véghez kovalensen kapcsolódó terminális proteinek (pl: lineáris mitokondriális plazmidok; Gri□ths, 1995); (v) kovalensen kapcsolt egyszálú hairpin az egyik végen, a másikon 5 bp egységek tandem ismétlődése (*Fusarium* mitokondrium; Walther és Kennell, 1999); (vi) komplex ismétlődések több típusa mtDNS-ben (pl: *Theileria parva*; Shukla és Nene, 1998; *Amoebidium parasiticum*; Burger és mtsi, 2003) vagy lineáris plazmidokban (pl: mF plazmid *Physarum polycephalum*-ban; Takano és mtsi, 1994). (vii) telomerikus loop (t-loop) struktúra *C. parapsilosis* lineáris mtDNS végeken, melyek magi megfelelőjükhöz hasonlóan egyszálú telomer faroknak a kétszálú telomer régióba történő inváziójával keletkeznek (Tomaska és mtsi, 2001). A tipikus nukleáris telomer 5-

8 bp közt van, ehhez képest a mitokondriális telomerek jóval hosszabbak, valamint nem tartalmaznak konszenzus szekvenciákat.

Élesztőkben kétféle telomer típus fordul elő: (i) *Williopsis* és *Pichia* fajok esetén terminális inverted repeat-ek, kovalensen kötött egyszálú hairpinnel (Dinouël és mtsi, 1993); (ii) *Candida parapsilosis, C. salmanticensis* és *Pichia philodendra* esetén (Nosek és mtsi, 1995) a terminális inverted repeat-ek hosszú repetitív egységek tandem sora, 5' túlnyúló véggel (Rycovska és mtsi, 2004; Nosek és mtsi, 1995; 2002; 2005). A *C. parapsilosis*-ban 2D gél elektroforézis segítségével különálló, cirkuláris, szuperspiralizált DNS darabokat fedeztek fel, melyek mérete n*0,75 kb-nak adódott, amik DNáz I-gyel relaxálhatóak. A folyamat során a telomer ismétlődések visszahurkolódva egy ún. t-loop-ot alkotnak, amelyek aztán lefűződnek (Tomáška és mtsi, 2002). A replikációjuk ezek után a rolling circle mechanizmus szerint történik, ami által a megszintetizálódott konkatemerek az utód mtDNS-hez képesek kapcsolódni. Az inkomplett repetitív egységeket tartalmazó formák nem képesek az 5' véget fenntartani, így a replikáció során elvesznek és/vagy csak transzkripcióra használódnak el. Csak a tandem repeat-eket tartalmazó formák replikáció kompetensek. A nagy repeat egységeket tartalmazó magi telomerek a (ii) típusú élesztő mitokondriális telomerekhez hasonlítanak, és mivel azok telomeráz függő mechanizmussal replikálódnak, így felmerül ennek a lehetősége a mitokondrium esetén is. *C parapsilosis*-ban írták le az első mitokondriális telomer kötő fehérjét is (mtTBP), amely fehérje a mtDNS 5' túlnyúló végéhez képes kapcsolódni. A fehérjét egy magi gén, az MTP1 gén kódolja.

2. 4. Mitokondriális intronok vizsgálata

Az élesztő mitokondriális genomok komparatív analízisének egy részét a mitokondriális intronok vizsgálata képezi, azok pozíciójának összehasonlítása, valamint aminósav szekvencia-motívumok alapján történő csoportosítása. Az élesztő mitokondriális intronok az I. és II. típusú intronok közé tartoznak (GI és GII), melyek ribozimok és mobilis genetikai elemek. Az I. típusú intronok saját splicing-jukat katalizálják, guanozin iniciált transzészterifikációs lépések folyamán. Homing endonukleáz géneket tartalmaznak, melynek segítségével egy gén introntartalmú alléljéből az intronmentesbe vándorolhatnak, ez a folyamat a homing. Szekvencia szinten kevéssé homológok, de másodlagos és harmadlagos struktúrájuk konzervált. Méretük 200-3000 nt közé eshet. Open reading frame-t (ORF) a core struktúrán kívüli loop-on tartalmazhatnak, melyek endonukleázszerű fehérjéket kódolnak. Self-splicing (önkivágódás) van, de előfordulnak olyan I. típusú intronok is, melyek a splicing-hoz segítő fehérjét igényelnek, ami

magi vagy saját kódolású maturáz. Az I. típusú intronokat konzervált aminosav motívomuk jelenléte alapján négy családba sorolják: 1. His-Cys box, 2. LAGLI-DADG, 3. GIY-YIG, 4. HNH családok. A 900-2500 nt méretű II. típusú intronok splicingja kétlépcsős transzészterifikációval történik hasonlóan a magi mRNS intronokéhoz. A II. típusú intronok reverz transzkriptáz, maturáz és endonukleáz aktivitású fehérjéket kódolhatnak, terjedésük retrohominggal vagy retrotranszpozícióval történhet. Self-splicing ritkán van, de lassú és külső, segítő fehérjét igényel, mely magi vagy intron kódolt. A másodlagos struktúra konzervált, egy központi körről 6 dupla hélix (I.-VI.) ágazik el. ORF-t a IV. doménben tartalmazhatnak. Az intronszerzésnek két típusa létezik: homing (ugyanabba a génbe kerül vissza (GI: endonukleázos homing, GII: retrohoming)), illetve transzpozíció. A GII intronok reverz splicingban vehetnek részt. Az intronvesztés elég ritka esemény, de exon konverziót okozhat, ha a kivágódó intron az exonból is eltávolít egy részletet (Michell és Perfect, 1995; Kennel és mtsi, 1993).

2. 5. A mitokondriális genom vizsgálatok gyakorlati vonatkozásai

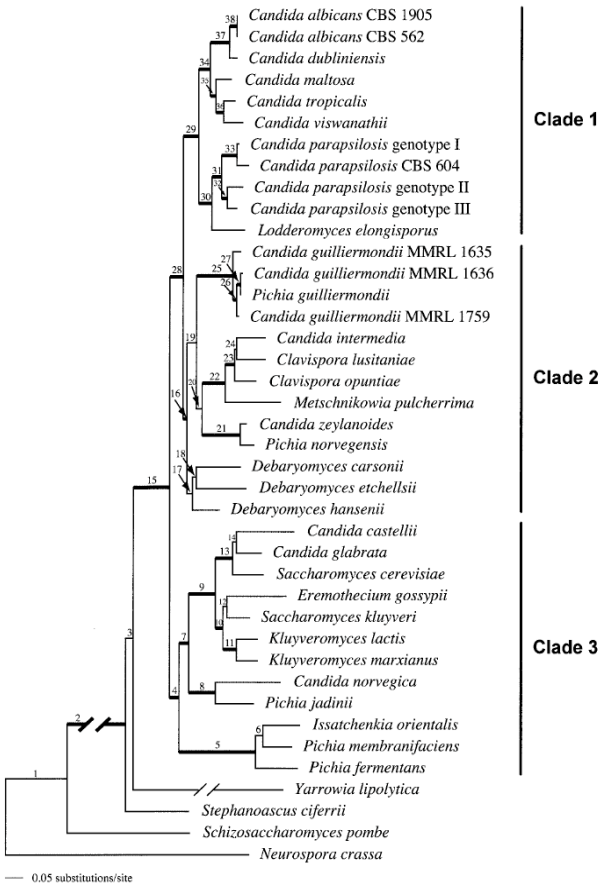
A különböző élesztő fajok mitokondriális DNS vizsgálatát több tényező is indokolja. A komparatív genomika új alapelveket vethet fel a genom dinamikában; a komplett genom szekvenciák további funkcionális tanulmányokhoz szolgáltathatnak alapot; a gombák, köztük a klinikai mintákban lévő patogén fajok molekuláris diagnosztikájához, evolúció biológiai vizsgálatokhoz szolgál alapot; a patogén gombák mitokondriális genomja pedig terápiás alkalmazások célpontja lehet. A patogén gombák egy része lineáris genommal rendelkezik, melynek replikációjával interferáló drogok kifejlesztése egy alternatív lehetőség a humán patogén gombákkal szembeni terápiában. A lineáris molekulák telomerjei molekuláris markerek lehetnek PCR alapú diagnosztikában. A telomeráz-negatív humán tumorsejtekben telomer cirkulum dependens útvonal működik a telomer fenntartásban, így a mitokondriális DNS vizsgálatok annak modellezésére is alkalmasak (Regev és mtsi, 1998). A lineáris mt genomok egyedi modell rendszert jelenthetnek a lineáris kromoszómák evolúciós vizsgálatában, ugyanis a magi és mitokondriális telomerek felépítése igen hasonló: tandem egységek (magi: 6 bp, mt: *C. parapsilosis*-nál 738 bp hosszúak), túlnyúló vég (magi: 3', mt: 5'), t-loop-ok és telomer proteinek jelenléte. A magi telomerek fenntartásában a telomeráz vesz részt, alternatív útvonal(ak) és t-cirkulumok mellett, míg a mitokondriumban telomerázt eddig nem tudtak kimutatni. A vég-

replikációs problémára megoldást jelentő mechanizmusok paralellek az eukarióta sejtmagban lejátszódó alternatív, telomeráz független útvonalakkal. A mt-ális telomerek replikációjának vizsgálata fényt deríthet a korai eukariótákban a lineáris kromoszómák eredetére.

2. 6. A Candida albicans klád

Az Ascomycota törzsön belül három osztályt különböztethetünk meg: *Euascomycetes* (fonalas gombák), *Hemiascomycetes* (élesztőgombák), és *Archiascomycetes*. A *Hemiascomycetes* osztályba tartozó *Saccharomycetales* rendbe tartoznak opportunista humán patogének (*Candida albicans*), növénypatogének valamint vízzel és rothadó vegetációval asszociált kozmopolita élesztők. Az ebbe a rendbe tartozó fajok általános jellemzői a következők: (i) nincs vagy csak kezdetleges hifa, (ii) hasadással vagy sarjadzással szaporodó vegetatív sejtek, (iii) a sejtfalban nincs kitin, és (iv) egyedül vagy láncban képződő aszkuszok (Kirk és mtsi, 2001). Diezmann és munkatársai 2004-ben filogenetikai vizsgálatokat végezve hat magi gén szekvenciáját alapul véve három nagy csoportot különítettek el a *Saccharomycetales* renden belül (1. ábra). Az első klád főleg *Candida* fajokat tartalmaz, a második a *Metschnikowiaceae* családot foglalja magába, mint monofiletikus csoportot, valamint a *Debaryomyces* nemzetség három faját, és a *Candida guilliermondii*-t. A harmadik klád kizárólagosan a *Saccharomycetaceae* család tagjait foglalja magába (Diezmann és mtsi, 2004).

Ezen felosztás szerint az opportunista humán patogén gombák nagy többsége az első kládba került. Fiziológiásan a normál humán flóra alkotói, hámfelületeken jelentős számban találunk *C. albicans* és *C. parapsilosis* fajokat egyaránt. Virulenciájuk a jó megtapadási és pszeudohifa képzési képességükkel, valamint specifikus virulencia faktorok termelésével magyarázható. Ilyen virulencia faktorok például a különféle lipázok, proteázok és egyéb, a megtapadást segítő faktorok. Megbetegedést leggyakrabban a *C. albicans* okoz, de a *C. parapsilosis* szintén gyakori kórokozó (Lockhart és mtsi, 2008). Az *C. albicans* kládba humán patogén fajok mellett apatogének is találhatóak: *Candida maltosa* és *Lodderomyces elongisporus* (mely a *C. parapsilosis* teleomorf alakja).



1. ábra: A *Hemiascomycetes* osztály feltételezett filogenetikai kapcsolatai, Maximum likelihood analízissel 6 magi gén (ACT1, EF2, RPB1, RPB2, 18S rDNA és 26S rDNA) szekvenciájára nézve (Diezmann és mtsi, 2004)

Egy jelenleg is folyó nemzetközi project a *C. albicans* klád tagjainak taxonómiai kapcsolatait és a mitokondriális genom evolúcióját vette vizsgálat alá, mely során a kládban található élesztőgombák teljes mitokondriális genom szekvenálása, azok komparatív analízise történik.

2. 6. 1. *Candida maltosa*

A *C. maltosa* levegőben, talajban és torkolati vízekben, különösen szénhidrogénekben gazdag élőhelyeken előforduló imperfekt, apatogén élesztőgomba, ami a szénhidrogéneket, zsírsavakat és szénhidrátokat is képes metabolizálni (Spencer és mtsi, 2002). A legismertebb szénhidrogén-asszimiláló fajok közé a *C. maltosa*-n kívül a *Yarrowia lipolytica* valamint a *Candida tropicalis* tartoznak. A *C. maltosa* más szénhidrogén-asszimiláló élesztőktől eltérően a C6–9 n-alkánokat, a C10–16 folyékony alkánokat, a C19–32 szilárd n-alkánokat valamint a C40 n-alkánokat is metabolizálja. A *C. maltosa* képes oxidálni policiklikus aromás szénhidrogéneket

(PAH) is. A fajt a biotechnológia számos területén használják fel: (i) SCP (single cell protein) termelés; (ii) hidrofil intermedierek (pl: zsíralkoholok, zsírsavak és dikarboxilsavak) termelése az alkán oxidatív útvonalban (Umemura és mtsi, 1990); (iii) enzimjei biokatalizátorok (P450s, NADPH-P450 reduktáz, citokróm b5, FAOD, SOD, kataláz, Avetisova, 1991); (iv) heterológ protein termeltetés lehetséges gazdája; (v) mukonsav termeltetés catechol-ból (Gomi és Horiguchi, 1988); (vi) D-aminosavak termeltetése (Uemura, 1985; Uemura és mtsi, 1988); (vii) dohány és uborka rezisztenciájának promotálása virális (dohánymozaik vírus) és bakteriális (*Pseudomonas syringae pv lachrimans*) patogénekkel szemben, mannánok és származékaik bejuttatásával a növény intercelluláris terébe (Kovalenko és mtsi, 1992). A *C. maltosa, C. utilis* és *Y. (C.) lipolytica* apatogének, habár néhány törzs potenciális patogén lehet, illetve az élesztő SCP-vel (single cell protein) dolgozóknál-használóknál allergiás reakciók léphetnek fel. Ezek kiváltó okai a SCP termékben jelenlévő páratlan szénatomszámú zsírsavak, de nagyobb rizikófaktort jelentenek a nyers paraffinokban lévő toxikus komponensek, amik az élesztő sejtben akkumlálódnak.

2. 6. 2. *C. parapsilosis*

A *C. parapsilosis* egészséges egyénekben kommenzalistaként megtalálható élesztőgomba, de károsodott immunrendszerű egyénekben fertőzéseket képes kiváltani (Cassone és mtsi, 1995; Weems, 1992). A *C. parapsilosis* az egyik legfontosabb non-*C. albicans* humán patogén, mely a nozokomiális fungémiák 30%-ért felelős. Gyakran asszociált a következőkkel: szeptikus artritisz, peritonitisz, vaginitisz, illetve bőr- és köröminfekciók. Endokardiális szövetekhez való szelektív affinitása miatt jelentősége az endokarditiszek esetén is egyre nő. Újszülöttek esetén a halálos kimenetelű candidiasis-ok fő kiváltó oka.

Mitokondriális DNS vizsgálatok során kimutatták, hogy a genom lineáris konformációjú speciális terminális struktúrával (Nosek és mtsi, 1998), mely 738 bp egységek tandem sorából áll, 5’ túlnyúló véggel (Nosek és mtsi, 1995). Megfigyelték telomerikus minicirkulumok és 5’ végi telomer kötő protein jelenlétét, ami véd az enzimatikus degradációtól (Nosek és mtsi, 1999; Tomaska és mtsi, 1997, 2001). DNS-DNS reasszociációs vizsgálatok, RFLP és izoenzim profil vizsgálatokat követően a *C. parapsilosis* I., II. és III. csoportját három külön fajra osztották: *C. parapsilosis, C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* (Lin és mtsi, 1995; Roy és Meyer, 1998, Tavanti és mtsi, 2005). A *C. parapsilosis* fajon belül a különböző izolátumok mtDNS restrikciós enzim

vizsgálata (*Hind*III, *Eco*RV, *Pvu*II és *Kpn*I) azonos mintázatot mutat az eddigi vizsgálatok alapján (Camougrand és mtsi, 1988; Su és Meyer, 1989, 1991).

2. 6. 3. *C. albicans*

Az elmúlt évtizedekben a gombás fertőzések száma jelentősen megnőtt. A kórokozók közül a legnagyobb jelentőséggel a kommenzalista *C. albicans* bír, mely a normál humán flóra tagja, de immunkomprimált betegekben opportunista patogénként viselkedik (Pfaller és Diekema, 2007; Wisplinghoff és mtsi, 2003). A fertőzések nagy része nozokomiális megbetegedés, ezért a prevenciós stratégiák kidolgozása is egyre sürgetőbb feladat. A klinikai *C. albicans* izolátumok szubtipizálása epidemiológiailag több szempontból fontos: a fertőzések kialakulásának és a virulens törzseknek a felismerése valamint a fertőzések forrásának meghatározása (Dalle és mtsi, 2000; Eloy és mtsi, 2006; Stephan és mtsi, 2002).

A *C. albicans* egy diploid, imperfekt, dimorf élesztőgomba, mely melegvérű állatok, így emberek kommenzalistájakét orális és vaginális nyálkahártya felszíneken és az emésztőrendszerben kolonizál. A *C. albicans* fertőzések (candidiasis) egészséges egyénekben ritkán fordulnak elő. A candidiasis-nak több fajtája van: felszíni (orális és vaginális) és „mélyen fekvő" (*Candida* okozta myocarditis és akut disszeminált *Candida septicaemia*). Jellemző kórképük pl: a csecsemők pelenka dermatitisze, a szájpenész, az orofaringeális candidiasis. Ezen kívül a gomba megjelenhet a vérben (candidaemia), vagy a vizeletben (candiduria). Legsúlyosabb formájában léziók is képződhetnek, amely hám és kötőszöveti elhalásokkal jár. Az elmúlt két évtizedben különböző okok miatt (immunoszuppresszáns kezelések, hosszú idejű katéterezés, széles-spektrumú antibiotikum kezelés) a *Candida* fertőzések száma drámaian megnőtt (Molero és mtsi, 1998).

A *C. albicans* imperfekt, de a genom szekvenálást követően szexuális rekombináció megvalósulására utaló bizonyítékot találtak, ugyanis azonosítottak egy lokuszt (MTL), mely hasonlít a *Saccharomyces cerevisiae* mating-type (MAT) lokuszára (Hull és Johnson, 1999). Habár a *C. albicans* konstitutíven diploidnak bizonyul, a párosodási folyamatokhoz szükséges DNS-kötő proteineket, feromonokat, és feromon-receptorokat kódoló genetikai háttérrel rendelkezik (Tavanti és mtsi, 2003). Populációgenetikai tanulmányokból kiderült, hogy ez a patogén gomba nagyrészt klonális (Pujol és mtsi, 1993, 1997; Graser és mtsi, 1996; Lott és mtsi, 1999; Anderson és mtsi, 2001; Tavanti és mtsi, 2004). A kutatások azt mutatják, hogy a mating egy ritka esemény, a megfigyelt rekombinációk a homológ kromoszómák közötti mitotikus

rekombinációk vagy paraszexuális események következményei, mintsem valódi szexuális reprodukcióé (Odds és mtsi, 2007). Egy másik hipotézis szerint a mating gyakran előfordulhat, de csak közel rokon törzsek esetén (Soll és Pujol, 2003).

2. 6. 3. 1. *C. albicans* tipizálási módszerek

Az elmúlt évtizedekben számos molekuláris tipizálási módszert dolgoztak ki *C. albicans* izolátumok epidemiológiai vizsgálatára, de azok reprodukálhatóságának és standardizálásának hiánya korlátozza alkalmazásukat. Nagy előrelépést jelentett a törzsek differenciálásában a multilocus sequence typing (MLST) kidolgozása, amelyet eredetileg 1998-ban Maiden és munkatársai fejlesztettek ki *Neisseria meningitidis*-re, de használatát azóta egyéb baktérium törzsekre (Dingle és mtsi, 2001; Enright mtsi, 2000, 2001; Nallapareddy mtsi, 2002), manapság pedig már *C. albicans*-ra is kiterjesztették (Bougnoux és mtsi, 2002; Tavanti és mtsi, 2003, http://calbicans.mlst.net/). Az MLST egy jó eszköznek bizonyult a *C. albicans* izolátumok epidemiológiai és populáció genetikai vizsgálataihoz.

A klinikai *C. albicans* izolátumok differenciálására több módszer is létezik, melyek között a PCR alapú módszerek nagyszámban fordulnak elő, ilyenek például a mikroszatellit hosszpolimorfizmus (microsatellite length polymorphism–MLP, Garcia-Hermoso és mtsi, 2007) és a fentebb már említett multilocus sequence typing (MLST, Odds és mtsi, 2007, Pfaller és Diekema, 2007, Reiss és mtsi, 2000, Yeo és Wong, 2002), melyek sejtmagi DNS szintű különbségeket tárnak fel.

A *C. albicans* törzseket különböző klonális vonalakba lehet szétosztani, ezek meglétét korábbi, egymástól független vizsgálatokkal bizonyították: Ca3 fingerprinting, RAPD (random amplification of polymorphic DNA) és multilocus enzim elektroforézis (MLEE). MLEE-vel három csoportot különítettek el: I, II és III. klád (Észak-Amerika), amit Ca3 fingerprinting módszerrel kiterjesztettek még további kettő csoporttal: SA (South-Africa) és E (Europe) (Pujol és mtsi, 2005; Blignaut és mtsi, 2002; Soll és Pujol, 2003). A Ca3 próba a *C. albicans* genomban szétszórva elhelyezkedő repeat elemek szekvenciáját tartalmazza, melyben mikroevolúciós változások, inszerciók illetve deléciók következhetnek be (Pujol és mtsi, 1999). Napjainkban a multilocus sequence typing (MLST) módszer is igazolta az öt csoport meglétét (Tavanti és mtsi, 2005; Odds és mtsi, 2007) és további alcsoportok létét is felvetette. Mivel a populáció genetikai vizsgálatok nem vették figyelembe az alcsoportokat, így feltételezhető, hogy a rekombináció kládok között ugyan ritka, de azon belül gyakori lehet (Pujol és mtsi, 2005). Az MLST

vizsgálatok (Bougnoux és mtsi, 2004; Tavanti és mtsi, 2005; Odds és mtsi, 2007) hat vagy hét housekeeping gén internális régiójának polimorfikus nukleotidszekvenciájának azonosításán alapulnak. A minden lókusznál leírt genotípusok kombinációja jellemzi a diploid szekvencia típust (DST) minden törzsre. Az MLST reprodukálható adatokat eredményez, amellyel különbséget lehet tenni a törzsek között. Az MLST-t sikeresen alkalmazzák klinikai *C. albicans* izolátumok (http://calbicans.mlst.net/) epidemiológiájának vizsgálatára, illetve különböző ökológiai niche-ekről származó izolátumok diverzitásának tanulmányozására.

2. 6. 3. 2. EO3 régió vizsgálat

A fent említett módszerek mellett alternatívát jelent a mtDNS eredetű faj specifikus DNS fragmentum, az EO3 régió vizsgálata, mely az SC5314 törzs mtDNS-ének egy duplikált régiójában, 9071 nt-9954 nt között helyezkedik el (Shaw és mtsi, 1989; Wills és mtsi, 1985). Ez a régió polimorfizmust mutat, három különböző hosszúságú fragmentum (L, M, S) formájában fordul elő (Miyakawa és mtsi, 1992, Miyakawa és mtsi, 1993, Miyakawa és Mabuchi, 1994). Miyakawa és Ozowa 2009-ben restrikciós analízissel fényt derítettek a polimorfizmus okára, melyet két, kb. 50 bp hosszúságú DNS fragmentum (A és B szegmens) jelenléte vagy hiánya okoz. Ezen jelenség miatt az EO3 régió vizsgálata epidemiológiai szempontból igen fontossá válhat. Miyakawa és Ozowa 2009-ben négy típust különítettek el: az L tartalmazza az A és B szegmenst is, a méretben egyező MI és MII közül - *Bgl*II restrikciós hosszpolimorfizmus módszerrel vizsgálva – az MI csak az A-t, az MII csak a B-t, míg az S típus egyiket sem tartalmazza. A vizsgálatok kimutatták, hogy mind a *Bgl*II hasítóhelyeket, mind az A és B szegmenst ugyanazok az inverted repeat (IR) szekvenciák veszik körül: 5'-[CCACCCGA]-(A vagy B szegmens)-[TCGGGTGG]-3', illetve 5'-[CCACCCGA]-GATCAGAGATC-[TCGGGTGG]-3', az aláhúzott nukleotidok a *Bgl*II felismerőhelyét jelentik. Ezen inverted repeat szekvenciák az EO3 régión belül nemcsak a fent említett helyeken fordulnak elő, hanem mozaikszerűen eloszolva a teljes régióban megtalálhatóak, így feltételezhetően nagy szerepet játszanak a polimorfizmus kialakulásában. Mindezen tények miatt az EO3 régió vizsgálata egy alternatív eszköz lehet a klinikai *C. albicans* izolátumok elkülönítésében, epidemiológiai jelentősége egyre nő.

2.7. Killer jelenség

2. 7. 1. Előfordulás, ökológiai szerep

Minden biológiai társuláson (biocönózison) belül az élettérért ill. a tápanyagokért folytatott küzdelem (kompetíció) fontos szerepet játszik annak eldöntésében, hogy mely organizmusok sikeresek, melyek képesek benépesíteni az adott környezetet. Antagonista kölcsönhatás során a mikrobák extracelluláris termékükkel oly módon változtatják meg a környezetüket, hogy az kevésbé, vagy egyáltalán ne feleljen meg más organizmusok számára. Ez lehet nem specifikus (szerves sav vagy alkohol) vegyület, de ismertek specifikusabb hatású extracelluláris termékek is. Ilyenek a régóta ismert fungicid vagy fungisztatikus hatású, fehérjetermészetű killer toxinok (Golubev és Boekhout, 1995), illetve a nemrég leírt fungicid hatású extracelluláris glikolipidek (Spencer és mtsi, 1979, Golubev, 2001, 2004), melyekben cellobióz kapcsolódik glükozil kötéssel telített zsírsavakhoz (C16, C18). Ezt az antagonisztikus kölcsönhatást élesztőgombákban killer-jelenségnek nevezzük (Golubev és mtsi, 1997).

A természetben a killer jelenséget különböző életközösségekben vizsgálták (Ganter és Stammer, 1992). A gyümölcsök az alacsony pH és magas cukorkoncentráció miatt fontos élőhelyeknek számítanak, a róluk izolált élesztők negyede killer törzs. Sok élesztő endofita, potenciális biokontroll ágensként való felhasználásukat alátámasztja a jó kompetíciós képesség, sejtfaldegradáló enzimek, antifungális metabolitok termelése, és a gazda rezisztenciájának illetve a mikoparazitizmusnak az indukálása (El-Tarabily és Sivasithamparam, 2006).

A killer fenotípus szerepe valószínűleg a társulás összetételének fenntartása, az idegen, invazív törzsek elleni védelem (Starmer és mtsi, 1987). A killer jelenség gyakrabban fordul elő különböző élőhelyekről származó élesztők között, mint az egy helyen élők között. Egy bizonyos fokú, a rezisztenciához vezető adaptáció várható el limitált szelektív nyomáson, az azonos helyen és időben élő közösségekben. A fogékony sejtek denzitása sokkal alacsonyabb egy killer törzs jelenlétében, mint egy nem-killerében. Adott élőhelyről származó termelők toxinjára általában a nem arról a területről származó élesztők mutatnak érzékenységet. Az élesztőgomba-közösség összetételét a killer fenotípuson kívül meghatározza pl. az adott növény és az élesztőgomba közti interferencia, kompetíció és mutualizmus.

2. 7. 2. Általános jellemzés

Az ismert antifungális glikolipidek hatásspektruma széleskörű (Cheng és mtsi, 2003); mind *Ascomycota,* mind *Basidiomycota* élesztők ellen, valamint fonalasgombákkal szemben is aktívak. Hatásukra a sejtmembrán permeabilitása megváltozik, elveszti integritását, végül bekövetkezik a sejthalál. A sejtmembrán károsodásának hátterében valószínűleg az áll, hogy a cellobiolipidek (*Cryptococcus humicola*, Putckov és mtsi, 2002) képesek a membrán lipidmátrixába épülni. Ezt erősíti az a megfigyelés is, miszerint a cellobiolipidekre való érzékenységet elsősorban a membrán lipidösszetétele (szterol tartalom) határozza meg (Avis és Belanger, 2002). A killer toxinok, vagy mikocinek gombák által termelt oligopeptidek, proteinek vagy glikoproteinek, amelyek közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás nélkül képesek elpusztítani más, általában azonos vagy rokon fajba tartozó, érzékeny gombatörzseket. Méretük 5 és 190 kDa között mozog, általában hőérzékenyek és szűk, savas pH-tartományban aktívak (Buzzini és mtsi, 2007). Az élesztőgombák kétféle toxint termelhetnek: mikocinnak azt a toxint nevezzük, ami csak a termelő közeli rokonaira hat, mikrocinnek azt, amelyik szélesebb hatásspektrumú (Golubev és mtsi, 1997). A mikocinek glikoproteinek, általában 10-20 kDa nagyságúak (kivétel pl: *Pichia anomala* - 80 kDa), proteázokra valamint magas hőmérsékletre érzékenyek. A baktericinekkel analóg mikrocinek oligopeptidek, kb. 1 kDa méretűek, proteázokra rezisztensek és nem érzékenyek a magas hőmérsékletre.

A gombasejt alakját, annak integritását a gomba sejtfal determinálja, ami főleg szénhidrátokból, illetve kötött vagy szabad fehérjékből áll. A fő sejtalkotó a ß-1,3-D-glükán (50%), mely néhány ß-1,6-D-glükán oldalláncot (5%) (Fleet, 1991), valamint mannoproteineket tartalmaz. A ß-1,6-D-glükán 15%-ban fordul elő, ami 14%-ban tartalmaz ß-1,3-D-glükán oldalláncokat. Mindezek mellett igen kis mennyiségben (0,6-9%) kitin fordul elő, ami a sarjadzási zónákban koncentrálódik (Kollár és mtsi, 1995). A sejtfelszíni poliszacharidok receptorként betöltött szerepe széleskörben elfogadott, ezen kívül a receptorok sejt interakciókban betöltött szerepe is ismert (Hutchins és Bussey 1983).

Az érzékeny sejtek felismerése, illetve a sejt belsejébe jutás kétlépcsős, receptormediált hatásmechanizmussal valósul meg. Az első lépésben a toxin specifikusan köt a szenzitív sejt falának valamely komponenséhez. A killer toxinok elsődleges receptora változatos, *Hansenula mrakii* LKB 169 törzs (Kasahara és mtsi, 1994), *S. cerevisiae* K1 és K2 toxin (Hutchins és Bussey, 1983), *Hanseniaspora uvarum* (Radler és mtsi, 1990) és *Pichia membranifaciens* killer toxin (Santos és mtsi, 2000) esetén a ß-1,6-D-glükán, *S. cerevisiae* K28 (Schmitt és Radler, 1987)

és *Zygosaccharomyces bailii* toxin (Schmitt éa Neuhausen, 1994, Weiler és Schmitt, 2003) esetén mannoproteinek, míg *Kluyveromyces lactis* toxin (Takita és Castilho-Valavicius, 1993) esetén kitin az elsődleges receptor. Ezt követően a toxin aktív alegysége a citoplazmamembránhoz jut, ahol kölcsönhatásba kerül egy másodlagos receptorral. A sejtfalhoz történő kötődés gyors, energiát nem igénylő, míg a sejtmembránhoz való kapcsolódás lassabb, energiabefektetéssel járó folyamat (Bussey és mtsi, 1990; Magliani és mtsi, 1997; Schmitt és Breinig, 2002). A kötődés erősen pH-függő, mely magyarázhatja a toxinok szűk pH-optimumát.

A különböző killer toxinok igen eltérő hatásmechanizmussal rendelkeznek. A legtöbb ismert killer toxin a plazmamembránt támadja. A *S. cerevisiae* K1 toxinja a TOK1 csatornát aktiválja (Ahmed és mtsi, 1999, Sesti és mtsi, 2001), a K2 növeli a permeabilitást az ionok számára, míg a *Pichia kluyveri* toxinja a membránba épülve ionáteresztő csatornát képez (Kagan, 1983). A sejtmembrán dezorganizálásán kívül a toxinok gátolhatják a sejtfal bioszintézisét (Takasuka és mtsi, 1995), indukálhatják a sejtciklus leállását a G1/S-fázisban, valamint gátolhatják a DNS-szintézis (Schmitt és mtsi, 1996). A *K. lactis* által termelt toxin esetében megállapították, hogy a G1 stop hátterében speciálisan módosított tRNS-molekulák hasítása áll (Jablonowski és Schaffrath, 2001, 2007). A *Pichia acaciae* PaT toxinjának DNS-károsító hatása programozott sejthalált indukál az érzékeny sejtekben (Klassen és mtsi, 2007). Az utóbbi két toxin új, párosodást és szaporodást gátló hatását is leírták (Klassen és mtsi, 2006).

A killer fenotípussal rendelkező törzsek immunisak saját toxinjukra, más toxinokra viszont érzékenyek lehetnek. Léteznek úgynevezett neutrális törzsek, melyek ugyan nem termelnek toxint, de nem is érzékenyek rá. A rezisztencia és immunitás oka két eltérő mechanizmus lehet, melyek között különbséget kell tenni. Ez a kétféle érzéketlenség eltérő mind mechanizmusában, mind taxonómiai jelentőségében. A reziszens törzsek a killer proteinek abszorpciójához nélkülözhetelen specifikus sejtfal-receptorokat nem tartalmazzák (taxon kapcsolt tulajdonság). Az immunitás hátterében a killer proteinek kompetitív inhibítorai állnak, melyek szaturálják a membrán receptorokat (klón kapcsolt tulajdonság). A neutrális törzsek a mycocin szintézis genetikai hátterével rendelkeznek, de azt csak inaktív formában termelik, vagy nem szekretálódik ki a toxin, így immunisak rá (Golubev, 2006).

2. 7. 3. Genetikai háttér

A killer toxin termelése lehet kromoszómális DNS (*S. cerevisiae, P. anomala*), dsRNS vírus (*S. cerevisiae*), vagy lineáris DNS plazmid (*Kluyveromyces lactis,* Gunge és mtsi, 1981)

által szabályozott. Mind a mikocin, mind a mikrocin termelés a legtöbb bazidiomikotában úgy tűnik, hogy magi gén által szabályozott, mivel a plazmid-eliminálló ágensek által nem csökkent a killer aktivitás, illetve plazmid vagy vírus jelenlétét nem sikerült kimutatni. A killer élesztők 70%-ában azonban dsRNS kódolja a killer fenotípust.

2. 7. 3. 1. dsRNS víruson kódolt killer rendszerek

Az élesztőgombák számos képviselőjének a sejtjeiben találtak már kettősszálú dsRNS elemeket, amelyek a sejt citoplazmájában helyezkednek el kapszid fehérje által burkoltan. Ezeket az elemeket nem nevezhetjük valódi vírusoknak, hiszen nem ismert a sejten kívüli életciklusuk, hivatalos elnevezésük ezért vírusszerű partikulum (virus-like particle, VLP, Wickner, 1996). Öröklődésük citoplazmatikus, nem-mendeli szabályokon alapul. Terjedésük sejt-sejt kontaktus vagy ivaros spórák útján (*Zygosaccharomyces*) történik. Jelenlétük legtöbb esetben a gazda sejt killer aktivitását okozza. A killer aktivitással rendelkező sejt által termelt toxin elpusztítja a rokon vagy azonos fajba tartozó, és a toxinra érzékeny sejteket. A killer toxinok általában glikoproteinek, hatásmechanizmusuk kétféle lehet: a sejtmembránon pórusokat képezve ionszivárgást okoznak, vagy a sejtciklus leállításával idéznek elő sejthalált. Léteznek olyan élesztőgomba törzsek is, melyekben a dsRNS elemek jelenléte nem okoz fenotipikus változást, azaz kriptikus a dsRNS funkciója, pl: *Dipodascus magnusii*, *Phaffia rhodozyma* (Johnson, 2003)*, Candida curvata*, *Wickerhamia fluorescens,* és *Yarrowia lipolytica* (Groves és mtsi, 1983). A legtöbb esetben azonban ezen elemek megléte együttjár a killer fenotípussal: *S. cerevisiae* (Wickner, 1996), *Trichosporon pullulans* (Golubev és mtsi, 2002), *Cryptococcus hungaricus* (Pfeiffer és mtsi, 1998), *Cystofilobasidium bisporidii* (Karamysheva és mtsi, 1991*)*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* (Golubev és mtsi, 2003), *H. uvarum* valamint *Z. bailii* (Weiler és Schmitt, 2003).

A killer fenotípus jelenségét először 1963-ban *S. cerevisiae* esetében írta le Bevan és Makower. A killer törzsek sejtjeiben 2 különböző méretű dsRNS elem található, amelyek külön kapszidáltak egyforma nagyságú, 39 nm-es izometrikus patikulumokba. A kisebb dsRNS-t tartalmazó partikulum az M (szatellit) vírus, míg a nagyobb az L-A (helper) vírus (Totiviridae), amely szükséges az M vírus replikációjához és enkapszidálódásához. Az M vírusnak háromféle típusa ismert: M1, M2 és M28, ezek egymással inkompatibilisek, azaz egy sejt csak az egyik típust tartalmazza. Ezek a dsRNS-ek kódolják a K1(19 kD), K2 (21,5 kD) és a K28 (21,5 kD) killer toxinokat, illetve azok prekurzorait, a preprotoxint (α, β és egy centrális γ domén, Golubev

és mtsi, 2003; Marquina és mtsi, 2002), ami különböző posztranszlációs modifikációkon megy kereszül. Az érett toxinban az α és β alegységek diszulfid hidakkal kapcsolódnak. A K1 és K2 toxinok hatásmódja megegyezik, a sejtfalban lévő β-1,6-D-glükánhoz kapcsolódnak (ez lépés pH-függő, kis affinitású, de gyors). A második (nagy affinitású, lassú és energiaigényes) lépés a sejtmembrán receptorokhoz való kötődés. Csak azok a sejtfal receptorok működnek, amelyek a sejtmembrán közelében találhatók (növekedési zóna). A receptorhoz való kötődéshez mindkét alegység szükséges. Az α alegység 2 hidrofób doménje által pórusokat hoz létre a sejtmembránon, első sorban Na^+ és K^+ ion kiáramlást okoz, ami sejthalálhoz vezet. A K28 toxin receptorai a sejtfalban lévő mannoproteinek. A sejtciklust a korai S fázisban állítja le, a sarj nem válik le az anyasejtről, a magi DNS-t bezárja az anyasejtbe. A saját toxinnal szembeni immunitásért a toxin prekurzora felelős. Az α és a γ alegységek szükségesek az immunitás expressziójáért: a γ domén N-terminálisa lép kölcsönhatásba az α doménnel, ezáltal blokkolja annak toxikus aktivitását, de a receptorral való kölcsönhatást nem, így az éretlen toxin lemaszkírozza a membránreceptorokat (Zhu és mtsi, 1993). A KRE gének mutációja is rezisztenciához vezet, mivel ezek a gének a receptorok szintézisében játszanak szerepet (Marquina és mtsi, 2002).

A *S. cerevisiae* mellett az ozmotoleráns *Z. bailii* is egy jól tanulmányozott killer élesztő (Magliani és mtsi, 1997). A 412-es törzs citoplazmájában két dsRNS található: ZbV-L és ZbV-M. A kisebb dsRNS egy 10 kDa nagyságú, monomer toxint (zygocin) kódol, ami az immunitásért nem felelős. A pH 5 felett és magas hőmérsékleten inaktív zygocin az érzékeny sejtek sejtfalában lévő mannoproteinekhez kapcsolódik és a plazmamembránt depolarizálja, így elveszik a sejt integritása. A zygocinnak széles a hatásspektruma, különböző humán- és növénypatogén élesztő- és fonalas gombák ellen jól használható antifungális szerként. A *H. uvarum* szintén két dsRNS-t hordoz (HuV-L és HuV-M). A toxin hatékonyan gátolja a glükán bioszintézist Schmitt és Neuhausen, 1994).

2. 7. 3. 2. Lineáris DNS plazmidok által kódolt killer tulajdonság

Az élesztőgombák lineáris DNS plazmidjai (Pfeiffer és mtsi, 2002) a sejtek citoplazmájában helyezkednek el. Többségükben kriptikusak, de a *K. lactis* (Schmitt és Breinig, 2002), a *P. acaciae* (Worsham és Bolen, 1990, Bolen és mtsi, 1994) és a *P. inositovora* (Ligon és mtsi, 1989, Hayman és Bolen, 1991) esetében a sejtek killer aktivitását okozzák. A *K. lactis* két plazmidot tartalmaz: pGKL1 (8,8 kb) és a pGKL2 (13,4 kb). Mindkettő végén terminal inverted

repeat (TIR) szekvencia található, melyhez terminális protein kapcsolódik, amin a replikáció iniciációja történik. A transzkripciót a plazmidon kódolt RNS polimeráz végzi, ami a gének előtti "upstream consensus" szekvenciákhoz (UCS) kapcsolódik. A kisebb plazmid 4 ORF-et tartalmaz: az ORF1 a DNS polimerázt, az ORF2 és 4 a killer toxin alegységének a prekurzorait kódolja, míg az ORF3 az immunitásban játszik szerepet. A nagyobb plazmid 10 ORF-et hordoz, melyek DNS és RNS polimerázt, helikázt valamint egy terminális régiót felismerő fehérjét kódolnak. A széles hatásspektrumú toxin 3 alegységes: az α és a β prekurzor egy ORF-ről íródik át, hidrofób szignál szekvenciát tartalmazva. A prekurzorról az ER-ban szignál szekvencia hasítódik le, az α alegység glikozilálódik, majd a Golgi apparátusban egy kex2-szerű proteáz hasítására alakulnak ki az érett alegységek. A γ alegység egy másik ORF-ről íródik át és szintén érésifolyamaton megy keresztül, amihez szükséges a másik két alegység. Az α-nak kitináz aktivitása van, a β-nak a hidrofób doménjei szükségesek a membránon való átjutáshoz, míg a γ a sejtciklust állítja le a G1-S fázis határán.

A *P. acaciae* is két plazmidot tartalmaz: pPac1-1 (13,6 kb) és a pPac1-2 (6,8 kb), amelyek homológiát mutatnak a *K. lactis* plazmidjaival (Bolen és mtsi, 1994). A toxin 3 alegységes, széles hatásspektrumú, hatásmechanizmusa azonos a *K. lactis*-éval (Schmitt és Breinig, 2002). A *P. inositovora* 3 plazmidot (18 kb, 13 kb és 10 kb) tartalmaz. A killer fenotípussal a pPin1-1 és a pPin1-3 kapcsolt, a pPin1-2 nem. Az immunitás nem kapcsolatos a plazmidokkal, valószínűleg kromoszómán kódolt.

2. 7. 3. 3. Nukleáris gének által kódolt killer tulajdonság

A *S. cerevisiae* esetében a dsRNS víruson kódolt killer toxinok mellett két további toxint is leírtak. A KHR (killer of heat resistant) és KHS (killer of heat susceptible) killer toxinok kromoszómán kódoltak, a IX. kromoszóma bal, illetve az V. kromoszóma jobb karján (Goto és mtsi, 1990). Az érett toxinok egy fehérje láncból állnak, 20 illetve 75 kD nagyságúak. A *Williopsis* és *Pichia* fajok legtöbb képviselője által kódolt killer toxin szintén magi gén által kódolt, killer spektrumuk rendkívül széles: a *S. cerevisiae*-től a *C. albicans*-ig terjed antifungális hatásuk. Egy törzs többféle toxint is termelhet (Golubev és mtsi, 1995). A *Pichia* és *Williopsis* killer toxinok a β-1,3-D-glükán szintézist gátolják, ami a fő poliszacharid polimer a sejtfalban, szerepe a sejtmorfológia és ozmotikus integritás fenntartása (Buzzini és mtsi, 2004).

A *W. mrakii* két toxint termel: HM-1 és K-500. A HM-1 egy nem glikozilált polipeptid, aminek magas a hő (10–100°C) és pH (pH 2-11) stabilitása. E tulajdonságokért a sok diszulfid kötés felelős, ami az aktivitást is meghatározza. A HM-1 a β-1,3-glükán szintézissel interferál,

így a sejtfalat ozmotikusan törékennyé vagy defektessé teszi és lítikus sejthalált okoz. Az intakt, ép sejteket öli meg, a protoplasztot nem. A K-500 killer toxin egy savas polipeptid (1,8-5 kDa), magas hőmérsékleten és 4°C-nál alacsonyabb hőmérsékleten inaktiválódik. Nagymértékű *Candida* ellenes hatása van (Kimura és mtsi, 1993, Hodgson és mtsi, 1995).

A *P. kluyveri* killer toxinja savas glikoprotein, ami ioncsatornákat képez a megtámadott sejtfalban. Ez K^+ és ATP szivárgást okoz, a sejten belüli pH-t csökkenti, az aminósav felvétel pedig gátlódik (Pintar és Starmer, 2003). A halotoleráns *P. farinosa* KK1 törzs egy olyan toxint termel (SMK: salt-mediated toxin) ami maximális killer aktivitását 2 M NaCl mellett mutatja (Suzuki és Nikkuni, 1994). A toxin két alegységből áll, melyek diszulfidkötéssel szorosan kapcsolódnak, savas pH-n és 6 M urea melett is, pH 6 felett azonban az alegységek disszociálnak. A *P. anomala* élesztőgomba killer törzsei nem rokon mikrobák ellen széles hatáspektrummal rendelkeznek: élesztők *(C. albicans)*, hypomyceták, baktériumok ellen egyaránt aktív toxint termelhetnek.

2. 7. 4. *Pichia anomala*

A *Pichia (Hansenula) anomala* egy aszkomikóta, heterotallikus sarjadzó élesztőgomba, mely kedvezőtlen körülmények között pszeudohifákat képez. Általánosan elfogadott, hogy természetes környezetében diploid formában van jelen. Számos helyről izolálták már: gyümölcsök és zöldségek (Kurtzman, 1998), szemes gabonafélék (Lacey és Magan, 1991), kukorica silók (Kitamoto és mtsi, 1999), illetve magas cukortartalmú élelmiszerek (Lanciotti és mtsi, 1998; Tokuoka és mtsi, 1985). Nem-*Saccharomyces* típusú borélesztőként is leírták már a fermentáció korai és középső szakaszában (Mingorance-Cazorla és mtsi, 2003; Rojas és mtsi, 2003). A bor mellett más fermentált italok és élelmiszerek természetes fermentációjában is szerepet játszik (Sujaya és mtsi, 2004). Ezek mellett a *P. anomala* egy igen fontos és hatékony biokontroll ágens, melyet sikerrel alkalmaznak különböző fonalas gomba infekciók ellen, amik zárt raktári szemestakarmányokat (Druvefors és mtsi, 2002; Petersson és Schnürer, 1998), almát (Jijakli és Lepoivre, 1998) vagy szőlőt (Masih és mtsi, 2000) fertőznek meg. Alacsony vízaktivitás és alacsony pH melletti növekedési képessége miatt magas cukortartalmú élelmiszerek romlását idézheti elő (Lanciotti és mtsi, 1998; Tokuoka és mtsi, 1985), illetve silókban a pH-t képes növelni a tejsav felemésztésével (Jonsson és Pahlow, 1984). Policiklikus aromás szénhidrogének biodegradációjában is szerepet játszhat (Feng és mtsi, 2004).

A *P. anomala* egy „biosafety level 1” organizmus, az egészséges egyénekre nem jelent veszélyt (de Hoog, 1996). A szakirodalomban nincsenek adatok veszélyes mikotoxinok vagy allergén spórák képzéséről. Fertőzéseket rákos betegek esetén írtak le, fokozottan a gyerekek illetve koraszülöttek és a sebészeti intenzív osztályon fekvő egyedek veszélyeztetettek (Aragão és mtsi, 2001; Chakrabarti és mtsi, 2001; Kalenic és mtsi, 2001; Thuler és mtsi, 1997). A leírt esetek egyike sem volt halálos kimenetelű, ennek ellenére a *P. anomala*-ra egy növekvő jelentőséggel bíró patogénként kell tekintenünk a súlyosan immunkomprimált egyének esetében (Hazen, 1995).

A *P. anomala* WC 65 törzse által termelt toxin jóval nagyobb (83 kDa), mint legtöbb, eddig ismert élesztő által termelt glikoprotein (86% protein, 14% szénhidrát). Nagyon kevés 83 kDa-nál nagyobb toxint termelő törzsről tudunk, ilyen például a *K. lactis* toxinja, ami három alegységből áll (A: 99 kDa; B: 30 kDa; Y: 27,5 kDa, Stark és mtsi 1986, 1990), és a *H. anomala* halofil toxinja (kb. 300 kDa, Kagiyama és mtsi, 1988). Egy adott élesztő többféle toxint termelő képességének lehetőségét leírták már korábban (Polonelli 1985 és mtsi; Sawant és mtsi, 1988), de ezt a WC65 törzs esetén nem tudták bizonyítani, valószínűbb a toxinok aggregációjának lehetősége. A WC65 törzs killer toxinjának receptora a β-1,6-D-glükán. A széles hatásspektrum, illetve főleg a *C. albicans* elleni killer hatás a *P. anomala* kemoterápiás alkalmazásának lehetőségét veti fel (Sawant és mtsi, 1989). Két másik, jól jellemzett *P. anomala* toxin a NCYC 432 és K törzsének glikoprotein toxinja (panomycocin), melyek exo-ß-1,3-glükanáz aktivitással bírnak, N-terminális aminosav szekvenciájuk megegyezik, méretük 47, illetve 45,7 kDa (Izgü és mtsi, 2006). Ezen toxinok pH 3-5,5 tartományban és 37ºC-ig nagy stabilitásúak. A *Pichia* fajok toxinjairól általánosságban elmondható, hogy monomerek, habár egy nemrégiben leírt toxin, a halotoleráns *P. farinosa* élesztő toxinja heterodimer (Kashiwagi és mtsi, 1997). Az YF07b törzs egy tenger vízből izolált *P. anomala* törzs, toxinja 47,0 kDa méretű, hőmérsékleti optimuma 40ºC. A fehérje igen stabil, aktivitása megmarad 60°C-ig is, termostabilitása (Wang és mtsi, 2007) jóval jobb a „szárazföldi” *Pichia* fajok toxinjainál. A YF07b toxin pH 3-5 között stabil (optimum pH 4,5), magasabb pH-n elveszti aktivitását (Izgü és mtsi, 2005; Santos és mtsi, 2000), ebben a tekintetben azonos a „szárazföldi” toxinokkal. A *P. anomala* ATCC 96603 törzs által termelt UP25F toxin egy széles hatásspektrumú glikoprotein, nukleáris gének kódolják. A toxin sejtfalreceptorok a *C. albicans*-on elsősorban a csírázó sejteken és germinációs tubusokon vannak, tehát a toxin a fiatal sejtek ellen aktívabb. A toxin jól használható AIDS-ben szenvedő, tüdőgyulladásos betegek tüdejében széles körben előforduló *Pneumocystis carinii* ellen is (Cailliez és mtsi, 1994, Seguy és mtsi, 1998).

2. 7. 5. Killer toxinok alkalmazási lehetőségei

2. 7. 5. 1. Ipari hasznosítása: élelmiszeripar és fermentációs folyamatok

Killer törzseket az élelmiszeriparban a fermentációs folyamatok starter kultúráinak szelektálására használnak. A fermentációs folyamatok 88%-ában killer élesztőgombák jelenlétét figyelték meg, túlsúlyuk a fermentációs szakaszban és a szüretelési periódusban figyelhető meg. A sör- és borgyártás során a spontán fermentációt régebben a gyümölcsben illetve a mustban természetesen előforduló élesztőgombák (*Kloeckera, Metschnikowia, Hanseniaspora)* végezték, de ma már a megkívánt genetikai jellemzőkkel bíró *S. cerevisiae*-t, illetve killer törzseket használnak starter kultúraként (Young és mtsi, 1981). A genetikailag manipulált törzsek fontos borkészítő jellemzőkkel (pl.: magas fermentációs ráta, etanol termelés, SO_2 rezisztencia, β-1,4-endoglükanáz termelés, flokkuáció és kedvező aroma) rendelkeznek, ezenkívül jó antagonista tulajdonságúak és szelekciós előnnyel rendelkeznek a bor és a sör minőségét károsan befolyásoló, fertőző törzsekkel (*Candida*, *Pichia*) szemben (Magliani és mtsi, 1997). A killer élesztők starterként való használata fontos lehet még az újra fermentációtól, illetve a filmképződéstől való védelemben is (Heard és Fleet, 1987).

Az élelmiszer-romlás komoly problémát jelent, hiszen az étel élvezeti romlásán keresztül gazdasági károkat, és súlyos egészségügyi gondokat válthat ki. A tejtermékekből izolálható leggyakoribb fajok közé tartoznak a *Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces* és *Yarrowia* nemzetség fajai (Fleet, 1992; Jakobsen és Narvhus, 1996; Pitt és Hocking, 1997; Viljoen, 2001). Stratford 2006-ban több élelmiszer-romlást okozó fajt foglaltak össze: alacsony pH-jú ételekben *Z. bailii* és *Issatchenkia orientalis*; borokban *Dekkera bruxellensis, P. anomala* és *P. membranifaciens*, sörben *Dekkera anomala*; sajtokban *Y. lipolytica*; magas só és cukor tartalmú ételekben *Debaryomyces hansenii* és *Zygosacharomyces spp.* fajok. Az élelmiszerek tartósításában is használnak biokontroll ágensként killer élesztőket (Palpacelli és mtsi, 1991, Pfeiffer és mtsi, 2002, 2004; Petersson és Schnürer, 1995). Az ételek élettartamának növelésére és a káros mikrobák elszaporodása elleni védelemre rutinszerűen alkalmaznak különböző antimikrobiális anyagokat (szorbát és benzoát származékok, Papadimitriou és mtsi, 2007, Mollapour és Piper, 2001), azonban számos olyan élesztőt írtak már le, ami rezisztens ezekre a kémiai anyagokra (Hazan és mtsi, 2004). A rezisztensek ellen nyújt

egy jó alternatívát a killer toxinok alkalmazása, amikkel neutralizálni lehet a nem kívánatos mikrobákat (Michalcakova és mtsi, 1993).

2. 7. 5. 2. A killer toxinok, mint potenciális antifungális szerek

A nagy mennyiségű antibiotikum használat a humán gomba fertőzések nagy mértékű növekedését idézte elő az elmúlt években. A fogékony mikroorganizmusok hagyományos antibiotikumokkal szemben fellépő rezisztenciája miatt egyre nagyobb szerepet kapnak a killer toxinok a kísérleti gombainfekciók kezelésében (Schmitt és Breinig, 2002). Ehhez azonban viszonylag nagy mennyiségben, koncentrált és tiszta formában kellene előállítani őket. A nem-*Saccharomyces* élesztők által termelt killer toxinok széles hatásspektrummal rendelkeznek, így különböző humán-, állat- és növénypatogén gombák ellen jól használhatók lehetnek. A természetes antibiotikumok alacsony molekulasúlyú anyagok, amelyeket baktériumok, gombák termelnek. A killer toxinok nem toxikusak magasabbrendű eukarióta sejtekre, ugyanis a toxinok receptorai csak élesztő- és magasabbrendű gombákban fordulnak elő, emlősökben nem, így az emberi szervezetre nézve nem ártalmasak. Mivel e toxinok többségének csak szűk pH-és hőmérséklettartományban van aktivitása, ezért nem alkalmasak orális és intravénás adagolásra, de felszíni mikózisok ellen jól használhatók. Problémát jelenthet, hogy a molekulák nagy méretük miatt immunválaszt válthatnak ki így a jövőben fontos feladat lenne szintetikus származékok készítése is. A *Z. bailii* (Magliani és mtsi, 1997) által termelt zygocin például jól használható *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* és *Sporothrix schenckii* humán- illetve a *Fusarium oxisporum* fitopatogén gombák ellen.

2. 7. 5. 3. Killer toxin expresszió transzgénikus növényekben

Számos kísérlet van jelenleg is folyamatban olyan transzgénikus növények előállítására, melyek növény-patogén gombák elleni toxikus fehérjét termelnek. A toxintermelésért felelős gének integrálása és expresszáltatása a kukoricában rezisztenciát kölcsönöz a növénynek a növénypatogén fajokkal (pl. *Ustilago maydis*) szemben. Az *U. maydis* egy toxinját, a KP4-et kelvirág mozaik vírus promóter által kontrollált, virális toxin cDNS-t tartalmazó transzgénikus dohánynövénnyel sikerült expresszáltatni. Már egy kis darabka dohánylevél is elegendő toxint termelt ahhoz, hogy hatékonyan elpusztítsa a KP4-re érzékeny gombák sejtjeit (Koltin és mtsi, 1980, Steinlauf és mtsi, 1988, Finkler és mtsi, 1992, Pfeiffer és mtsi, 2002, 2004).

2. 7. 5. 4. Heterológ proteinszekréció

Heterológ proteinek expresszióját és tisztítását általában prokarióta rendszerekben (pl. *E. coli* vagy *Bacillus subtilis*) végzik. Eukarióta fehérjék tervezése esetén a bakteriális rendszer azonban gyakran nem elég hatékony, mivel nem képes olyan, több lépéses, poszttranszlációs modifikációkat véghezvinni, mint a fehérje N-glikolizálása, foszforiláció, vagy az acetiláció. Élesztőgombák megfelelő gazdasejteknek bizonyultak heterológ eukarióta fehérjék termeltetésére és tisztítására. A problémát mindössze az jelenti, hogy az idegen fehérjék nagy része a sejten belül maradt, a szekretált fehérjéknek ugyanis rendelkeznie kell egy hidrofób N-terminális szignál szekvenciával, ami a fehérjét a szekretórikus útra irányítja. Nemrégiben kimutatták, hogy a *S. cerevisiae* M28 vírusából származó szignál szekvencia hatékonyan működik *Schizosaccharomyces pombe* sejtekben, ezáltal a preprotoxin alapú vektorok megfelelő eszközök lehetnek heterológ fehérjék hatékony szekretáltatására élesztőgombákban (Pfeiffer és mtsi, 2002, 2004; Petersson és Schnürer, 1995).

2. 7. 5. 5. Törzsazonosítás killer toxin érzékenység alapján

A killer toxinok hatás spektruma igen különböző, sokszor az egy fajhoz tartozó törzsek különböző érzékenységet mutatnak ugyanazzal a toxinnal szemben. Gombatörzsek biotipizálása killer szenzitivitás mintázat (KSP) alapján olcsóbb, könnyebben kivitelezhető megoldást jelent (Boekhout, 1997, Lopes és mtsi, 2006), mint az általánosan használt molekuláris módszerek, pl. mtDNS-RFLP, PFGE vagy a különböző PCR-alapú technikák (Corte és mtsi, 2005), a módszer azonban nehezen standardizálható, a gátlási zónák meghatározása erősen szubjektív lehet, főleg kis mértékű gátlás esetén. Továbbá taxonómiai eszközként szolgálhat a basidiomyceta élesztőgombák rendszerezésében (Pfeiffer és mtsi, 2002).

3. Anyagok és módszerek

3. 1. Felhasznált törzsek

3. 1. 1. *Candida albicans* törzsek

Törzsgyűjteményes törzsek:

C. albicans SC5314
C. albicans WO-1
C. albicans 1006
C. albicans ATCC 90028
C. albicans CBS 562
C. albicans ATCC 10231
C. albicans ATCC 14051
C. albicans ATCC 14053
C. albicans ATCC 16053
C. albicans ATCC 28517
C. albicans ATCC 44829
C. albicans ATCC 90028
C. albicans ATCC 64385
C. albicans NEQUAS 4661
C. albicans CBS 2695, Puerto Rico (Pur)
C. albicans CBS 2706, Argentina (Arg)
C. albicans CBS 2712, China (Chn)
C. albicans CBS 5736, Republic of South Africa (Rsa)
C. albicans CBS 6589, United Kingdom (UK)
C. albicans CBS 6910, New Zealand (Nzl)
C. albicans CBS 8838, USA
C. albicans CBS 9120, Japan (Jpn)
C. albicans ATCC 90028, USA
C. albicans ATCC 10231, n.a.
C. albicans ATCC 10261, Brasil (Bra)

Klinikai izolátumok: lásd 1. táblázat

3. 1. 2. *Candida parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis* törzsek

Klinikai izolátumok

C. parapsilosis 1181/1
C. parapsilosis 3929
C. parapsilosis 5068/1
C. parapsilosis 5308
C. parapsilosis 5311
C. parapsilosis 5312
C. parapsilosis 6791

C. parapsilosis 11881
C. parapsilosis 25329
C. parapsilosis BP3
C. parapsilosis BP42
C. parapsilosis BP46
C. parapsilosis BP54
C. parapsilosis BP63
C. parapsilosis BP73
C. parapsilosis BP90
C. parapsilosis BP93
C. parapsilosis BP94
C. parapsilosis BP101
C. parapsilosis BP113
C. parapsilosis BP39
C. parapsilosis BP59
C. parapsilosis BP75
C. metapsilosis BP57
C. metapsilosis 12821
C. orthopsilosis MC0488
C. parapsilosis CBS604

3. 1. 3. Intron analízishez felhasznált törzsek

C. albicans SC 5314
C. dubliniensis CD 36
C. orthopsilosis MCO 456
C. orthopsilosis MCO 471
C. metapsilosis MCO 488
C. metapsilosis PL 48
C. parapsilosis CLIB 214
C. parapsilosis SR 23
C. neerlandica NRRL Y-27057
C. viswanathii CBS 4024
C. maltosa CBS 5611
C. tropicalis MYA-3404
C. sojae CBS 7871
Lodderomyces elongisporus CBS 2605
Debaryomyces hansenii CBS 767

3. 1. 4. Toxin kísérletekhez használt törzsek

Lásd 2. táblázat

3. 1. 5. Baktérium transzformációhoz használt törzsek

Escherichia coli XL-1 Blue
Escherichia coli JM 109

3. 2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

3. 2. 1. Tenyésztéshez és törzs fenntartásra használt táptalajok, tápoldatok

YM (malátás táptalaj)	3% malátakivonat
	0,5% élesztőkivonat
	1% glükóz
	(3% agar)
YPD	0,5% élesztőkivonat
	1% pepton
	1% glükóz
	(3% agar)
VMM	0,5% $(NH_4)_2SO_4$
	0,1% KH_2PO_4
	0,05% $MgSO_4$
	1% glükóz
	0,1% Wickerham-féle vitaminoldat

Wickerham-féle vitamintörzsoldat (100 ml-re)

0,2 mg folsav
0,2 mg biotin
40,0 mg Ca-pantotenát
200,0 mg inozitol
40,0 mg niacin
20,0 mg p-aminobenzoesav
40,0 mg piridoxin.HCl
40,0 mg aneurin.HCl
20,0 mg riboflavin

3. 2. 2. Toxintermelés körülményeinek optimalizálására használt tápoldatok

YM4, YPD4, VMM4: YM, YPD, VMM táptalaj pH 4-re beállítva citrát-foszfát pufferrel

3. 2. 3. Transzformációhoz használt táptalajok, tápoldatok

LB tápoldat 1% NaCl
1% trypton
0,5% élesztőkivonat

LB^{amp} táptalaj: LB tápoldat, 2% agar, 100 μg/ml ampicillinnel kiegészítve

3. 3. Egyéb felhasznált oldatok, reagensek

3. 3. 1. Mitokondriális DNS izolálásához használt anyagok

ETS-1 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
5 mM Na-EDTA
0,44 M szacharóz

ETS-2 10 mM Tris-HCl (pH 8)
100 mM Na-EDTA
0,44 M szacharóz

MTS 20 mM Tris-HCl
0,44 M szacharóz
5 mM $MgCl_2$

DNáz (Sigma)

LETS puffer 0,1 M LiCl
10 mM Na-EDTA
10 mM Tris-HCl (pH 8)
0,5% Nátrium dodecil szulfát (SDS)

Lízis puffer 15 ml 0,2 M Tris (pH 8)
1,7 ml 0,1M EDTA
0,34 g N-laurylsarcosine (Sigma)

CsCl (Reanal)

bisBenzimid (Sigma)

paraffinolaj

TE puffer (10 mM Tris (pH7)-1 mM EDTA)

dialízis membrán

3. 3. 2. Totál DNS izolálásához használt anyagok

Hagyományos módszer (Leach et al., 1986)

LETS puffer

üveggyöngy

fenol-kloroform-izoamil-alkohol 25:24:1 arányú elegye (PCI):

kloroform-izoamil-alkohol 24:1 arányú elegye (CI)

abszolút etanol/ izopropanol

70% alkohol

RNáz

Alternatív módszer

Lízis puffer (SET)	1% (w/v) SDS
	50 mM EDTA
	100 mM Tris (pH 8)

7 M ammónium-acetát (pH 7)

Izolálás kittel: MasterPure^{TM} Yeast DNA Purification Kit Epicentre^{R} Biotechnologies, Madison, WI, USA)

3. 3. 3. Plazmid DNS izolálásához használt anyagok

Lízis puffer (GET)	glükóz (50 mM)
	EDTA (10 mM, pH 8)
	Tris-HCl (25 mM, pH 7,5)
	1 mg/ml lizozim (Reanal)
Alkalikus SDS	0,5 ml 10% SDS
	0,1 ml 10 mM NaOH
	4,4 ml steril desztillált víz
„High salt”	3 M Na-acetát/ 3 M K-acetát (pH 4,5 jégecettel beállítva)
TE puffer	10 mM Tris (pH7)
	1 mM EDTA

3. 3. 4. DNS könyvtár konstrukcióhoz használt anyagok

DNS nebulizáció (fizikai törés)

BioNebulizátor (S. J. Surzycki, Department of Biology, Institute for Molecular and Cellular Biology, Indiana University)

25 % glicerol

abszolút etanol, 3 M Na-acetát

End-repair	dNTP mix
	Klenow enzim
	Klenow puffer
	T7 DNS polimeráz
Foszforiláció	T4 DNS ligáz puffer
	T4 polinukleotid kináz
Ligálás	T4 DNS ligáz
	T4 DNS ligáz puffer

3. 3. 5. Nukleinsav gélelektroforéziséhez használt oldatok:

TBE puffer	0,089 M Tris-HCl (pH 8)
	0,089 M bórsav
	0,02 M Na-EDTA
TAE puffer	0,4 M Tris-acetát (pH 8)
	0,02 M EDTA
Agaróz gél	TBE/TAE puffer
	0,8 vagy 1,5% agaróz (Reanal)
	1 μg/ml etídium-bromid (Sigma)
Loading puffer	40% szacharóz
	0,25 M brómfenolkék
	0,2 M EDTA
Molekulasúly marker	λ-pUC Mix (Fermentas)
	1 kb DNA ladder (Fermentas)

3. 3. 6. Fehérje analízishez használt anyagok

3. 3. 6. 1. Fehérje tisztításhoz és koncentráláshoz használt szűrők

Microcon YM-10, YM-30 (MILLIPORE, Bedford, MA, USA)

Ultrafree-MC 50 kDa, 100 kDa (MILLIPORE, Bedford, MA, USA)

nitrocellulóz filter, pórusátmérő 0,45µm (MILLIPORE)

3. 3. 6. 2. Fehérje koncentráláshoz használt anyagok

100% triklór-ecetsav (TCA)

aceton

etanol

3. 3. 6. 3. SDS PAGE-hez használt oldatok:

Gél: NuPAGE Bis-Tris HCl 4-12% grádiens koncentrációjú poliakrilamid gél

Futtató puffer: NuPAGE MOPS SDS puffer (20x)

1 M MOPS (3-(N-morpholino) propán szulfonsav)

1 M Tris (Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán)

69,3 mM SDS (nátrium dodecil szulfát)

20,5 mM EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav dinátrium sója)

Mintaelőkészítő puffer: NuPAGE LDS mintafelvivő puffer (4x) 10 ml

4,0 g glicerin

0,682 g Tris

0,666 g Tris-HCl

0,8 g LDS (lítium dodecil szulfát)

6 mg EDTA

0,75 ml 1%-os Serva BlueG250 oldat

0,25 ml 1%-os Fenol vörös oldat

Molekulasúly-marker: SeeBlue Plus2 (Invitrogen)

Gél festésére használt oldat (250 ml): 62,5 mg (0,025%) Coomassie Brillant Blue R250 (Reanal)

100 ml (40%) metanol

17,5 ml (7%) ecetsav

Gél mosásához használt oldatok (destaining):

1. mosó (250 ml): 100 ml (40%) metanol

17,5 ml (7%) ecetsav

2. mosó (250 ml) 12,5 ml (5%) metanol

17,5 ml (7%) ecetsav

3. 3. 6. 4. Ezüst festéshez használt anyagok

2 óra fixálás: 50% etanol, 0,05% formaldehid, 12 % ecetsav

3x20 perc 20% etanolos mosás

2 perc szenzitizálás: 0,02% Na-tioszulfát

2x1 perc deszt.vizes mosás

20 perc ezüst festés ($AgNO_3$)

1 perc deszt.vizes mosás

előhívás developing oldatban (2-5 perc): 6% Na-karbonát, 0,0004% Na-tioszulfát, 0,05% formaldehid

leállítás ecetsavval

3. 3. 6. 5. Natív gélelektroforézishez használt anyagok

1. Elektródpuffer törzsoldat (10x): 1 l-re: 28,8 g glicin + 6 g Tris (pH 8,3)
2. Szeparálógél puffer törzsoldat: 1 l-re: 366 g Tris (pH 8,9)
3. Gyűjtőgél puffer törzsoldat: 1 l-re: 45,4 g Tris (pH 6,8)
4. Szeparálógél törzsoldat: 100 ml-re: 39 g akrilamid + 1 g bis-akrilamid (60°C-on melegítve, majd átszűrve)
5. Gyűjtőgél törzsoldat: 100 ml-re: 38 g akrilamid + 2 g bis-akrilamid (60°C-on melegítve, majd átszűrve)

TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin, Reanal, Magyarország, Budapest)

PER (ammónium-perszulfát/ ammónium peroxodiszulfát, UCB S. A., Belgium)

Mintapuffer: 30 % glicerol
0,01 % brómfenolkék

3. 3. 6. 6. Oszlopkromatográfiához használt anyagok

CM Sepharose (Sigma)

epoxi-aktivált sepharose 6B agaróz (Sigma)

pusztulán

1 M etanolamin

0,1 M NaOH

0,1 M $NaHCO_3$ pH 8 + 0,5 M NaCl

0,1 M acetát puffer pH 4 + 0,1M NaCl

2 M urea (pH 4)+1,5 M NaCl

7,5% tritonX-100 (pH 4)+1,5 M NaCl

3. 3. 6. 7. Áramlási citometriához használt anyagok

Hanks puffer 0,137 M NaCl

5,4 mM KCl

0,25 mM Na_2HPO_4

0,44 mM KH_2PO_4

1,3 mM $CaCl_2$

1,0 mM $MgSO_4$

4,2 mM $NaHCO_3$

propídium jodid (PI, 1 mg/ml)

DAPI

3. 3. 7. Protoplaszt képzéshez szükséges anyagok

Előkezelő oldat 10 mM Tris-5 mM EDTA (pH 9)

0,1% ß-merkaptoetanol

Enzim oldat 0,7 M KCl

2% csigaenzim

0,01% NovoZym

3. 3. 8. Kariotipizáláshoz (PFGE) használt oldatok

„Low melting" agaróz 125 mM EDTA

1% „low melting" agaróz (LKB Produkter AB, Sweden)

NDS 0,5 M EDTA

10 mM Tris (pH 9,5)

1% Na-lauryl-sarcosin

20 mg/ml proteináz K (Sigma)

Futtató puffer	0,5x TBE
Gél	0,5% TBE, 1% agaróz PFGE-hez (Sigma)
Molekulasúly marker: λ DNS *Eco*47III/*Eco*91I (Fermentas)	

3. 3. 9. Enzimek

RNáz (10 mg/ml) (Sigma)

DNáz (Sigma)

S1 nukleáz (Sigma)

T4 DNS ligáz (Fermentas)

T4 polinukleotid kináz (Sigma)

Taq polimeráz (Zenon Bio Ltd)

3. 3. 9. 1. Restrikciós endonukleázok (Fermentas)

*Bgl*II	5'-A*GATCT-3'
*Bsu*RI *(Hae*III)	5'-GG*CC-3'
*Eco*RI	5'-G*AATTC-3'
*Eco*RV	5'-GAT*ATC-3'
*Hind*III	5'-A*AGCTT-3'
*Hinf*I	5'-G*ANTC-3'
*Hha*I (*Hin*6I)	5'-GC*GC-3'
*Pst*I	5'-CTGCA*G-3'
*Pvu*II	5'-CAG*CTG-3'

3. 3. 10. DNS jelöléshez használt anyagok

Klenow enzim (Roche)

Hexanukleotid keverék (Roche)

dNTP keverék (Roche)

Jelölés leállítás és DNS kicsapás:	0,2 M Na-EDTA (pH 8,0)
	4 M LiCl
	abszolút etanol

3. 3. 11. Southern-blot

Denaturációs oldat 15 M NaCl (87,7 g/l)
0,5 M NaOH (20 g/l)

Neutralizációs oldat 1,5 M NaCl (87,7 g/l)
0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 (78,8 g/l) 250 ml 2 M Tris-HCl/ 1l
2 ml 0,5M EDTA (pH 8)

20x SSC 0,3 M trinátrium-citrát (pH 7)
3 M NaCl

Hybond N filter (Amersham Biosciences, NJ, USA)

Whatman 3M szűrőpapír

3. 3. 12. DNS hibridizációhoz használt oldatok, reagensek

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

2. puffer: 1% blocking reagens 1. pufferben oldva

3. puffer: 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5)
0,1 M NaCl
50 mM $MgCl_2$

Színreakció oldata: 45 µl NBT-oldat
35 µl X-foszfát oldat
10 ml 3. puffer

10x SSC: 0,15 M Na-citrát (pH 7,0)
1,5 M NaCl

Standard hibridizációs puffer: 5x SSC
0,1% Na-lauryl-sarcosin
1% blocking reagens
0,02% SDS

Mosóoldatok: 1. oldat: 2x SSC, 1% SDS
2. oldat: 0,1x SSC, 0,1% SDS

3. 3. 13. Ligáláshoz használt reagensek

T4 DNS ligáz (Fermentas)

T4 DNS ligáz puffer (Fermentas)

3. 3. 14. Transzformációhoz használt anyagok

TCM puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

10 mM $CaCl_2$

10 mM $MgCl_2$

X-gal törzsoldat (Sigma)

25 μg/ml X-gal DMSO-ban oldva

IPTG törzsoldat (Sigma)

25 μg/ml IPTG steril desztillált vízben oldva

3. 3. 15. Elektroporáláshoz használt anyagok

SOC medium 0,5 % élesztőkivonat

2 % pepton

20 mM glükóz

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM $MgCl_2$

3. 3. 16. PCR reakcióhoz szükséges reagensek, primerek

Reagensek

dNTP mix (ATP, TTP, GTP, CTP) (Sigma)

25 mM $MgCl_2$ (Zenon Bio)

10 x Taq polimeráz puffer (Zenon Bio)

Taq polimeráz (Zenon Bio)

Felhasznált primerek (5'-3')

canalnad1 frw	GGCTATCGCTATGACTCG
canalnad1 rev	TAGAGATGAGGTGAGACAGG
canalnad2 frw	GGGTGGACTCTGACGCATAG

canalnad2 rev	AACCCATCTAATAGAGTTGG
canalnad4 frw	CCTTATCTTAGCAGGTGTATC
canalnad4 rev	AGGTGGTGGGTGGCTAGTAC
canalnad5 frw	TAGCCGGTGCTGAATCAGCTATCGG
canalnad5 rev	ACCTAGACCAAATCTAGGGGACTTG
CAR (rns) frw	GTGCCAGCAGTAGCGGTCATAC
CAR (rns) rev	AGTCGTATTACACCTGTAGCCC
canalrnl frw	GTAGAAAGGAGTAACCGATCTAAGC
canalrnl rev	GCAAGTACTATTTCACTGAGCTCCC
canalatp6 frw	AGGTAAGTGCGGGCCTGGAATGGTC
canalatp6 rev	CTATGTCTGGCCTTTCTTAATCCCC
canalcob frw	TGCTAATGGTGCCTCATTCTTCTTC
canalcob rev	TAGGGTTACTAACGGAGAAACCTCC
canal cox1 frw	GGTTAGTGCTATGGTAGC
canpa cox1 frw	GATTAGTGCTATGGTTGC
cox1 rev	CCTGAATGTGCACTAATTG
cox2 frw	GATTAGACGTGCCAACACC
cox2 rev1	GATGTGAGTATCAACAGGTAC
cox2 rev2	CGACCAGGTGTAGCATC
cox2 frwM	ATGATAAGATTAGACGTGCCAACACC
cox2 rev2M	GTTAAGACGACCAGGTGTAGCATC
CAPvuA (cox3) frw	CGGATCGGGTGTAGTGGAGG
CAPvuA (cox3) rev	CGTGGACTTAACCAAGGA
CAPvuB (cox3) frw	GGAGATCATACTTTAGCAG
CAPvuB (cox3) rev	GGGTGTAGTGGAGGTTTATC
canal FZRV frw	TTTCGCACTAATCACTCATCAATAGCACAG
canal FZRV rev	TCAAGTACCTAAATGGATAGTTACAGGCTCTTC

3. 4. Alkalmazott módszerek

3. 4. 1. Tenyésztési körülmények

Az élesztősejteket tenyésztés céljából YPD tápoldatban rázattuk (200 rpm) különböző hőmérsékleteken: *C. albicans* esetén 37°C, *C. parapsilosis*, *C. maltosa* és *C. guilliermondii* esetén esetén 30°C, *C. norvegica* és *Pichia anomala* esetén 20°C hőmérsékleten.

3. 4. 2. Totál DNS izolálás

Leach és munkatársai (1986) által kidolgozott módszert kissé módosítva a rázatott tenyészetből 1,5 ml-t centrifugáltunk, majd a sejteket 600 µl LETS pufferrel és 0,5 mm átmérőjű üvegyöngyökkel vortexelve tártuk fel. A sejtek feltárása után PCI-vel fehérje- mentesítettünk, a maradék fenol nyomokat CI hozzáadásával távolítottuk el. A vizes fázisból a DNS-t kétszeres térfogat abszolút etanollal vagy azonos menyiségű izopropanollal csaptuk ki, a kiülepített DNS pelletet 70 %-os etanollal mostuk, szárítottuk és TE pufferben vagy bidesztillált vízben oldottuk fel.

Alternatív módszerként a sejteket 500 µl lízis pufferben (SET) szuszpendáltuk fel, majd 0,5 mm átmérőjű üveggyöngyökkel 2 percig vortexeltük, ezután 275 µl 7M ammónium-acetátot adtunk a mintákhoz, és 65°C-on inkubáltuk 5 percig. Jégen hűtést követően 500 µl kloroform-izoamilalkohollal fehérjementesítettünk, a DNS-t pedig egyenlő térfogat izopropanollal csaptuk ki. A DNS-t 100 µl bidesztillált vízben vettük fel, és RNáz kezeltük 30 percig 37°C-on.

Totál DNS izolálás másik módjaként a MasterPure^{TM} Yeast DNA Purification Kit-et (Epicentre^{R} Biotechnologies, USA) használtuk, a gyártó utasításai szerint. A DNS pelletet 50 µl bidesztillált vízben oldottuk fel és RNáz kezelésnek vetettük alá (100 µg/ml) 30 percig 37 °C-on. A DNS-mintákat felhasználásukig -20 °C tároltuk.

.

3. 4. 3. Mitokondriális DNS izolálása (Láday és mtsi, 2001)

A kiválasztott törzs rázatott előtenyészetéből (24 órás, YPD-ben előnevelt) 10 ml-t oltottunk át 750-800 ml YPD tápoldatba, amit éjszakán át tenyésztettünk. A sejteket 3000 rpm-el 4°C-on 10 percig centrifugáltuk (Heraeus Multifuge 3 S-R). A kiülepedett sejteket ETS-1 oldattal fellazítottuk, majd Bead Beater (Biospec. Products, USA) segítségével, négyszer 30 másodperces (0,5 mm-es üveggyöngyös) kevertetéssel tártuk fel, 1-1 perces szüneteket tartva,

mindvégig hűtött körülmények között. A nem feltárt sejteket és sejttörmelékeket ismételt (4°C, 3000 rpm, 15 perc) centrifugálással távolítottuk el a homogenizátumból. A mitokondriumokat 30 perces 15000 rpm-es 4°C-on történő centrifugálással (Sorvall RC-5B) gyűjtöttük össze, majd 10 ml 0,2 mg/ml DNázt tartalmazó MTS oldatban szuszpendáltuk fel. A DNáz kezelést 4°C-on 1 órán át végeztük a szennyező magi DNS eltávolítása céljából. A DNáz aktivitást blokkoltuk 20 ml ETS-2 oldat hozzáadásával. Végül a mitokondriumokat 18500 rpm fordulatszámon 15 perces centrifugálással ülepítettük ki. A pelletet 2 ml LETS pufferben szuszpendáltuk fel, majd 20 percig, 65°C-on lizáltuk a mitokondriumokat. Hűtést követően egyenlő térfogatnyi PCI oldattal fehérje-mentesítettük, majd centrifugáltuk a mintákat (8000 rpm 10 perc, Heraeus Biofuge Pico). Ezt a lépést a felső, vizes fázis tisztulásáig ismételtük. A DNS-t abszolút etanollal csaptuk ki, tized térfogat 3 M Na-acetáttal kisózva. A DNS pelletet TE pufferben vagy bidesztillált vízben vettük fel, és 30 percig 37°C-on RN-ázzal (10 μg/ml) kezeltük.

Tisztább és nagyobb mennyiségű mtDNS izolálás céljából a mitokondriumokat 4 ml lízis pufferben szuszpendáltuk fel és 15 percig 65°C-on inkubáltuk. A hűtést és a sejtmaradványok centrifugálást (12000 rpm, 15 perc, 4ºC) követően 3,9 ml felülúszót pipettáztunk 4 g CsCl porra. Centrifugálás után az oldatot ultracentrifuga csőbe pipettáztuk, aminek az aljára 100 μl bisbenzimidet (10 mg/ml) mértünk. A csöveket paraffinolajjal légmentesen töltöttük fel, majd 15°C-on 50000 rpm-mel 20 óráig centrifugáltuk (Sorvall Ultra Pro 80). A nagyobb GC tartalmú magi DNS a CsCl grádiensen lentebb fog elhelyezkedni, mint a nagyobb AT tartalmú mitokondriális genom. A mtDNS-t UV (ultraibolya) fény alatt detektálva injekciós tűvel szívtuk le, majd 3-4 napig 4°C-on folyamatos kevertetéssel TE pufferben dializáltuk.

3. 4. 4. Agaróz gélelektroforézis

A nukleinsavak elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk, a DNS mintához „loading" puffert (6x koncentráció) adva. Az agaróz gélt 70 V feszültségen futtatuk a megfelelő pufferben (TAE vagy TBE).

3. 4. 5. mtDNS RFLP totál DNS-ből

A mtDNS-RFLP analízis során a totál DNS kivonatot GC tartalmú felismerőhellyel rendelkező enzimekkel, *Hae*III-mal és *Hha*I-gyel emésztettük egy éjszakán át a gyártó (Fermentas) utasításai szerint, 100 μl térfogatban 25 μl DNS mintával. A DNS-t ezután kétszeres

térfogatú alkohollal kicsaptuk, kiülepítettük majd beszárítottuk. A mintát 20 µl TE-ben vettük fel, majd 1%-os TAE-gélen elektroforézissel elválasztottuk a fragmentumokat. A sávokat UV (ultraibolya) fény alatt detektáltuk etídium-bromidos (1 µg/ml) festés után.

3. 4. 6. Izolált mtDNS enzimes kezelése

Annak megállapítására, hogy a *C. albicans* mtDNS-e néhány restrikciós enzimre nézve mekkora méretű fragmentumokat tartalmaz, *Bgl*II, *Eco*RV és *Eco*RI enzimekkel hasítást végeztünk. A DNS-t 10 egység restrikciós endonukleázzal 37°C-os termosztátban inkubáltuk 1 órán keresztül a gyártó cég által javasolt pufferekben. Ezt követően a fragmentumokat a mintákhoz adott loading puffer hozzáadásával 0,8% TAE gélen 70 V feszültségen választottuk el egymástól. A kapott fragmentumok méretének meghatározását GelBase/GelBlot Pro GelAnalysis Software-rel (Ultra Violet Product Ltd.) végeztük el.

3. 4. 7. Restrikciós térképek készítése Hamari és mtsi (1999) alapján

Az izolált mtDNS-t ***A*** és ***B*** enzimmel emésztettük. A fragmentumok gélből történő visszaizolálását követően ***B*** és ***A*** enzimekkel reciprok emésztést hajtottunk végre. Az ***A*** és ***B*** emésztés során kapott fragmentumok sorrendjének meghatározásához az agaróz gél egyik oldalára felvittük az izolált ***A*** fragmentumok ***B*** enzimmel emésztett mintáit, a másik oldalára az izolált ***B*** fragmentumok ***A***-vel emésztett mintáit, a gél közepére pedig az izolált mtDNS ***A***-val illetve ***B***-vel emésztett és ***A/B***-vel kettősemésztett mintáit kontrollként. Az elektroforézis során különböző időpontokban regisztráltuk a futást. A izolált mtDNS kettősemésztett mintájában a gélen szereplő összes fragmentumnak jelen kell lennie, amik a reciprok emésztett mintákban szintén megtalálhatóak. Ilyen módon a reciprok emésztés során kapott fragmentumokat vizuálisan össze lehet olvasni. A fragmentumok méretének meghatározása szükséges a fizikai térkép megalkotásához. Alternatív módszerként az ***A*** enzimmel történő emésztés utáni fragmentumokat pBluescript SK vektorba klónoztuk, majd ***A/B*** kettősemésztést végeztünk, a ***B*** enzimmel való hasítás utáni fragmentumokkal hasonlóképpen jártunk el. A továbbiakban a vizuális összeolvasás a fentivel megegyező módon történt.

3. 4. 8. Protoplaszt készítés (Kucsera és Ferenczy, 1986)

Egy napos rázatott tenyészetés után a kiülepített sejteket 5 ml előkezelő oldatban vettük fel, amihez 50 µl ß-merkaptoetanolt adtunk, és 20 percig inkubáltunk szobahőn. Centrifugálást követően a sejteket protoplasztképző enzim oldatban inkubáltuk 30 percig. A kezelést követően a protoplasztokat 0,7 M KCl-dal mostuk az enzim eltávolítása céljából, majd végül 50 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7,5) oldatban vettük fel.

3. 4. 9. Pulzáltatott mezejű gélelektroforézis (PFGE)

Klinikai *C. albicans* izolátumokból protoplasztokat állítottunk elő, amiket 125 mM EDTA oldatban (pH 7,5) felolvasztott 1% low melting agarózzal összekeverve agaróz blokkot készítettünk, majd a megszilárdult agaróz blokkokra NDS-t pipettáztunk és 50 µl proteináz K-t (20 mg/µl) adtunk hozzá. Három napig 37ºC-on inkubáltuk a blokkokat, naponta cserélve rajtuk a proteináz K tartalmú NDS-t (McCluskey és mtsai, 1990). Az elkészült agaróz blokkokat 0,5 M EDTA-10 mM Tris oldatban 4ºC-on tároltuk. A kromoszómális DNS-t CHEF-DR^{TM} II (Bio-Rad) apparátusban szeparáltuk 0,5x TBE pufferben 1% agaróz gélben 12ºC-on. Az elektroforézis körülményei a következők voltak: 120 mp 24 h-ig és 240 mp 36 h-ig 150 V feszültségen (Lupetti és mtsai, 1995). A gélt EtBr-dal festettük, defestettük desztillált vízben és UV fény alatt vizsgáltuk.

3. 4. 10. Southern blot

A Southern blot során az agaróz gélelektroforézissel elválaszott DNS molekulákat szilárd hordozóra, Hybond N filterre vittük. A DNS molekulák elválasztása után a gélt UV (ultraviola) fénnyel exponáltuk 5-10 percig, hogy a DNS-t kisebb darabokra törve növeljük a blottolás hatékonyságát. Ezt követően a gélt denaturációs oldatban rázattuk 30 percig a DNS denaturálása céljából, amit 2x20 perc rázatás követett neutralizációs oldatban, a pH visszaállítása miatt, ezt követte a blottoló piramis összeállítása. A gélre Hybond N filtert, 2 réteg Whatman 3M szűrőpapírt, 7-8 cm vastag papírtörölközőréteget, és kb. 500 g súlyt helyeztünk. A gél alá tett Whatman 3M papírcsíkot 20xSSC oldatba merítve, a kapillaritás transzfert alkalmazva a DNS molekulák a gélből átjutnak a Hybond N filterre. A blottolást egy éjszakán át végeztük, ami után a filtert 2xSSC oldatban mostuk (a 20xSSC kikristályosodása ellen). A filtert 3 perces UV expozíció után hibridizációs kísérletekhez használtuk fel.

3. 4. 11. DNS izolálás gélből

Az izolálni kívánt DNS-t TAE gélen futtatuk meg preparatív mennyiségben. A gélből UV fény alatt szikével vágtuk ki a megfelelő fragmentumot, ügyelve arra, hogy minél rövidebb ideig tegyük ki a DNS-t UV expozíciónak. A gélblokkot apró darabokra felszeleteltük a hatékonyabb izolálás céljából, majd a gélextrakciós kit utasításai szerint jártunk el. Egy kittet kiváltó, alternatív módszer során az apróra feldarabolt géldarabokat egy töltéssel nem rendelkező vattagolyót tartalmazó félbevágott, alul lyukas Eppendorf-csőbe tettük, majd a centrifugálást kis fordulatszámmal kezdve és fokozatosan elérve a 10-12000 rpm-et 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően az alsó csőbe összegyűlt DNS oldatot tized térfogat 3M Na-acetáttal kisóztuk, illetve kétszeres mennyiségű abszolút etanollal csaptuk ki. A beszárított DNS-t bidesztillált vízben vettük fel. A kivont DNS-t további felhasználásig -20ºC-on tároltuk.

3. 4. 12. DNS jelölés digoxigeninnel

A génekre írt specifikus primerekkel felszaporított PCR termékeket gélből visszaizoláltuk, majd ellenőrző futtatás után a DNS-t 10 percig tartó forró vízfürdőn történő hőkezeléssel denaturáltuk. A forralást azonnali jégen hűtés követte. 20 µl végtérfogatban összemértük a DNS jelöléséhez való reakció elegyet DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set (Roche) instrukciói alapján:

x µl jelölt, denaturált DNS (kb. 1 µg)
2 µl hexanukleotid mix
2 µl dNTP mix
1 µl Klenow enzim

A jelölés során az egyszálú DNS-hez hibridizálnak a random oligonukleotidok, ezeknek a 3'-OH végét használja a Klenow enzim primerként, és szintetizálja meg a komplementer szálat a DIG (digoxigenin) jelölt dUTP-t tartalmazó dNTP mixet felhasználva. A jelölést egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk, majd a reakciót leállítottuk 2 µl 0,2 M EDTA, 2,5 µl 4 M LiCl és 75 µl abszolút etanol hozzáadásával. A kicsapás 30 percig -70°C-on történt, ezt követően a centrifugálással (15 perc, 13000 rpm) visszanyert DNS pelletet 50 µl TE pufferben vettük fel.

A jelölt nukleinsav koncentrációjának ellenőrzésére a kapott minta 1 µl-éből 100, majd 5x (5 lépcsős) hígítási sort készítettünk mind a saját, mind a gyári kontroll mintákból. A hígítási

sor minden tagjából 1 μl-t vittünk fel HYBOND N+ filterre. Majd a következő mosási lépéseket végeztük:

- 5 perc, 1. pufferben (washing buffer, 100 ml/100 cm^2), szobahőmérséklet (25°C)
- 30 perc, 2. pufferben (blocking solution, 100 ml/100 cm^2), szobahőmérséklet (25°C)
- 30 perc, 2. pufferben oldott antidioxigenin-antitest kötött alkalikus foszfatáz (anti-DIG-AP, végkoncentráció: 75 mU/ml, 20 ml/100 cm^2)
- 2x 15 perc 1. pufferben (100 ml/100 cm^2), szobahőmérséklet (25°C)
- 5 perc 3. pufferben (detection buffer, 20 ml/100 cm^2), szobahőmérséklet (25°C)

A színreakció során zacskóba helyezett filterre kolorimetriás szubsztrátot (NBT/X-foszfát) tartalmzó 3. puffert adtunk (10 ml/100 cm^2), egyenletesen eloszlattuk a festéket, majd sötétben inkubáltunk. Az eredményt kolorimetriásan (kék elszíneződés) detektáltuk.

3. 4. 13. DNS hibridizáció

Az előhibridizációt 60-65°C-on 1 órán keresztül végeztük standard hibridizációs pufferben (20 ml/100 cm^2). A hibridizációt ugyanezen a hőmérsékleten végeztük egy éjszakán át 2,5 ml (2,5 ml/100 cm^2) 20 ng/ml jelölt anyagot tartalmazó hibridizációs oldatban.

Ezt követően a poszthibridizációs mosást végeztük:

2 x 5 perc 1. mosóoldat (50 ml/100 cm^2), szobahőmérsékleten (25°C)

2 x 15 perc 2. mosóoldat (50 ml/100 cm^2), 60-65°C-on.

Majd az előzőleg leírt mosási módszereknek megfelelően jártunk el.

3. 4. 14. Kompetens sejtek készítése

E. coli XL-1 Blue törzset LB tápoldatban OD 0,4-ig tenyésztettünk. Centrifugában (4°C, 15 perc, 3500 rpm) kiülepítettük a baktériumsejteket, majd jéghideg 100 mM $CaCl_2$ oldatban felszuszpendáltuk és 10 perc inkubáció után ismét centrifugáltuk őket. Az ismételten kiülepedett sejteket 5 ml 100 mM $CaCl_2$-ban fellazítottuk, és 1 órát 4°C-on kezeltük. A kompetens sejtekhez 15% végkoncentrációban steril glicerint adtunk, majd Eppendorf-csövekbe 200 μl-t adagolva -70°C-on tároltuk.

3. 4. 15. Elektrokompetens sejtek készítése

E. coli XL-1 Blue törzset LB tápoldatban OD 0,7-0,8-ig tenyésztettünk. Centrifugában (4°C, 15 perc, 3500 rpm) kiülepített baktériumsejteket egyre csökkenő mennyiségű, jéghideg 10 % glicerol oldatban mosogattuk 3-4-szer, a végén pedig 400 µl-ben vettük fel a sejteket, és 40 µl-ket adagoltunk szét.

3. 4. 16. Ligálás, transzformáció

A ligáláshoz a reakció elegyet 15 µl végtérfogatban mértük össze és egy éjszakán át 16°C-on inkubáltuk.

Reakció elegy: 1 µl T4 DNS ligáz (Fermentas)
1,5 µl T4 DNS ligáz puffer (Fermentas)
11,5 µl *Eco*RI emésztett DNS
1 µl *Eco*RI-emésztett pBluescript SK vektor

A jégen felolvasztott (kb. 15 perc) kompetens sejteket valamint 100 µl TCM puffert a ligálási elegyre mértünk. Az elegyet 25 percig jégen inkubáltuk, majd 3 percig 37°C-on hősokkot alkalmaztunk, végül 10 percig szobahőmérsékleten kezeltük. Ezután IPTG, X-Gal valamint ampicillin tartalmú LB táptalajra kiszélesztettük a sejteket, és egy éjszakán át, 37°C-s termosztátban tenyésztettük őket.

3. 4. 17. Plazmid preparálás *E. coli*-ból

Kék-fehér színszelekciót alkalmazva a fehér színű, azaz inszertet is tartalmazó transzformáns telepeket átoltottuk ampicillin tartalmú LB tápoldatba, amelyben egyenletes rázatás (200 rpm, 37°C) mellett ismét egy éjszakán át növekedtek. A sejteket 6000 rpm-el 7 percig centrifugáltuk, majd 100 µl GET pufferben szuszpendáltuk fel őket. 5 perces szobahőmérsékleten történő kezelés után alkalikus SDS-t (200 µl), majd „high salt" oldatot (150 µl) adtunk az elegyhez és 15-20 percig jégen kicsaptuk a nukleáris DNS-t. Ezután az elegyet 1:1 arányban PCI oldattal kezeltük. Centrifugálást (8000 rpm 10 perc) követően a felülúszóból abszolút etanollal kicsaptuk a plazmid DNS-t (-70°C, 30 perc), a DNS pelletet 70%-os alkoholban mostuk és a vákuumszárítóban való beszárítást követően bidesztillált vízben feloldottuk. 30 percig 37°C-on RNáz kezelést végeztünk. A plazmid DNS-t az adott enzimmel történő emésztés után 0,8% TAE gélen futtattuk meg.

3. 4. 18. Polimeráz láncreakció (PCR)

A reakció elegy a következő mennyiségeket tartalmazta az egyes komponensekből: 2,5 µl dNTP mix (10mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Sigma), 2,5 µl $MgCl_2$ (Zenon-Bio Ltd., Szeged, Hungary), 2,5 µl Taq polimeráz puffer (Zenon-Bio), 0,25 µl Taq polimeráz (Zenon-Bio), 1-1 µl (20 pmol) primer (forward, reverse), 14,25 µl bidesztillált víz, 1 µl 25x hígított totál DNS. A reakcióelegyre 30 µl ásványi olajat mértünk a minta párolgásának megakadályozására.

A reakciót PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) készülékben végeztük, melyet a következő paraméterekre állítottunk be:

1. 94°C, 2 perc (denaturálás)
2. 94°C, 30 másodperc (denaturálás)
3. Tm-5°C, 30 másodperc (annealing)
4. 72°C, 1 perc/kb (elongáció)
5. Ciklusszám (2-4. lépések): 35
6. 72°C, 5 perc (utópolimerizáció)
7. 4°C, 20 óra

A DNS-fragmentumokat 0,8 ill. 1,5% agaróz gélen választottuk el standard módszerek használatával (Sambrook és Fritsch, 1989).

3. 4. 19. DNS-szekvenálás

A PCR-termékeket elektroforézissel választottuk el, majd a DNS fragmentumokat GenElute™ PCR-tisztító kittel (Sigma-Aldrich) tisztítottuk. A szekvenálást ABI 373A DNS szekvenáló berendezésen (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) végezték a Szegedi Biológiai Központban.

3. 4. 20. DNS könyvtár konstrukció

Random szekvenáláshoz DNS könyvtárat hoztunk létre. Ehhez a DNS-t fizikailag törtük, nebulizáltuk (Okpodu és mtsai, 1994), egy erre a célra gyártott BioNebulizátorban. Egyszerre kb. 0,5-5 µg DNS-t nebulizáltunk, 25 % glicerin-végkoncentrációjú TE pufferben 2 percig 5-10 psi nyomáson állandó hűtés mellett. Ez körülbelül 1,5 kb-os fragmentumokat eredményezett. A

összetört DNS-t tartalmazó oldatot EtOH/3M Na-acetáttal precipitáltuk, és bidesztillált vízben vettük fel. A törés során többnyire ragadós végek jönnek létre, ezért a ligálás hatékonyságának növelése céljából a végeket feltöltöttük Klenow enzimmel és T7 DNS polimerázzal. Agaróz gélen visszaizoláltuk a 1,5 kb-os tartományba eső DNS molekulákat, amiknek a végét foszforiláltuk. A foszforilált fragmentumokat *Sma*I-emésztett, defoszforilált végű pUC19-es vektorba (az autoligálást elkerülendő) ligáltuk, majd a sómentesített ligátumot elektrokompetens *E. coli*-ba juttatuk be BioRad Gene Pulser apparátust használva a következő körülmények mellett: feszültség: 1,8 kV, ellenállás: 200 Ω, kapacitás: 25μF. A pulzus adása után azonnal 1 ml SOC médiumot adtunk a sejtekhez, amiket 45-60 percig 37ºC-on inkubáltunk, mielőtt ampicillines LB táptalajra szélesztettük őket.

3. 4. 21. Intron analízis

Az intron analízis során a *Candida* kládba tartozó fajok közül a Felhasznált mikroorganizmusok-ban leírt törzseket vizsgáltuk meg. A szekvenciákat Vector NTI software-rel vizsgáltuk, szekvencia összehasonlítást ClustalX programmal végeztünk. Open reading frame-ket az NCBI Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) programjával kerestünk, a nukleinsav szekvenciák alapján a fehérjére lefordítást a http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/ honlapon végeztük el, a kapott fehérje szekvenciákat pedig a Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) honlapján futtattuk le motívumok keresése céljából, az intronok típusának megállapítására.

3. 4. 22. *Pichia anomala* killer toxin vizsgálata

3. 4. 22. 1. Toxintartalmú fermentlé előállítása

A *Pichia anomala* törzset pH 4-es YM4 tápoldatban 25ºC-on 3 napig tenyésztettük, a fermentlevet (komplett fermentlé) sterilre szűrtük Millipore membránon (0,45 μm), a sejteket pedig szintén pH 4-es vitaminos minimál médiumba (VMM4) oltottuk át, amiben ugyanolyan körülmények között rázattuk fél napig, hogy a sejtekben felhalmozódott és még nem szekretált toxint kinyerjük. A VMM-es fermentlevet szintén sterilre szűrtük.

3. 4. 22. 2. Érzékeny törzsek tenyésztése

Az érzékeny törzseket egy napig 20 (*C. norvegica*) illetve 30°C-on (*C. guilliermondii*) rázatva tenyésztettük YPD tápoldatban (200 rpm).

3. 4. 22. 3. Élesztő-élesztőgomba antagonizmus vizsgálata

A komplett, illetve a minimál fermentleveket és/vagy a sejteket antagonizmus vizsgálatra használtuk. Az érzékeny sejtek tenyészetéből kb. 10^5 sejt/ml töménységű szuszpenziót készítettünk, mellyel YM4-es táptalajra masszívan oltottunk. Száradás után a felületre cseppentettük a termelő sejteket illetve a táptalajba fúrt lyukakba pipettáztuk a fermentlevet (150 µl). A gátlási zóna detektálása 20°C-on, 24 illetve 48 órás inkubáció után történt.

3. 4. 22. 4. Toxin stabilitásának vizsgálata

3. 4. 22. 4. 1. Hőmérséklet-optimum meghatározása

A hőmérséklet-optimum meghatározása érdekében a termeltetett aktív fermentleveket 20, 25, 30, 37 és 40°C-on inkubáltuk egy éjszakán át, majd aktivitásukat biotesztben mértük.

3. 4. 22. 4. 2. pH-optimum meghatározása

A pH-optimum meghatározásához YM táptalaj pH-ját 3, 4, 5, 6, ill. 7-re állítottuk citrát-foszfát pufferrel, majd ezeket használtuk a fent leírt bioteszthez.

3. 4. 22. 4. 3. Enzimes kezelés

A toxint tartalmazó fermentleveket egy éjszakán át inkubáltuk 20°C-on különböző proteázok – Proteináz K (Sigma-Aldrich, P-2308), Pronáz E (Merck KGaA, 1.07433) – 10 mg ml^{-1} koncentrációjú jelenlétében.

3. 4. 22. 5. Élőcsíraszám meghatározás

3. 4. 22. 5. 1. Csészés módszer

Az érzékeny törzsek tenyészetéből $5x10^6$ sejttel oltottunk be 1 ml *P. anomala* fermentlevet és 2 valamint 24 óráig, 25°C-on inkubáltuk a mintákat. A mintavételi időpontokban a 10^4/ml-re hígított mintából 50 µl-t szélesztettünk YPD táptalajra és 48 órás, 30°C-os inkubáció

után meghatároztuk az élőcsíraszámot. A telepképző egységeket számolva összehasonlítottuk a sejtek túlélési arányát.

3. 4. 22. 5. 1. Áramlási citometriás mérések

Az érzékeny törzsekkel $5x10^6$/ml sejtkoncentrációban oltottunk be 2 ml intakt és hőinaktivált (30 perc 100ºC-on) *Pichia* fermentlevet, majd 25ºC-on (*C. norvegica*) vagy 30ºC-on (*C. guilliermondii*) inkubáltuk őket 2, 12 és 24 óráig. Mintavételkor a kiülepített sejteket ($5x10^6$) 500 µl Hanks pufferben vettük fel, majd a szuszpenzióhoz 50 µl 1 mg/ml koncentrációjú propídium jodidot adtunk (PI). Néhány perces inkubációt követően a sejtek életképességét áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk (CyFlow Space Flow Cytometer, Partec). Mivel a festék membrán impermeábilis, csak a halott sejtekbe képes bejutni, azaz az élő sejtek PI negatívok, míg a halottak PI pozitívok. Az excitálás 488/+-16 nm-es lézerrel, míg a detektálás 682BP/+-22 nm-es band pass filterrel történt. Mivel számos toxin esetében leírtak a DNS-szintézisét ill. a sejtciklust gátló hatást, megvizsgáltuk, hogy a GN és N toxinnak van-e hasonló hatása. Ehhez toxinkezelt, ill. kezeletlen sejtek DNS-tartalmát mértük egy membrán permeábilis DNS festékkel (DAPI). Az excitálás hullámhossza 375/+-16 nm volt, a fluroreszcencia detektálása 455BP/+-16 nm-es band pass filterrel történt. A G1 illetve az S fázisban lévő sejtek a fluoreszcencia intenzitásuknak megfelelően külön csúcsként jelennek meg.

3. 4. 22. 6. Sejtfalkomponens affinitás vizsgálat

A különböző sejtfalkomponensekből (kitin, mannán, laminarin, pusztulán) 5 mg-ot mértünk 0,5 ml toxint tartalmazó fermentlébe és 20°C-on, 24 óráig inkubáltuk a mintákat. Ezt követően az érzékeny sejteket YPD táptalajra masszívan oltottuk, a sejtfalkomponenseket tartalmazó toxint a táptalajba fúrt lyukakba pipettáztuk (150 µl). A gátlási zónát 24 órás, 20°C-os inkubáció után detektáltuk.

3. 4. 22. 7. Toxinok protoplasztokra gyakorolt hatása

A toxinok sejtfalra gyakorolt hatását izoozmotikus közegben is vizsgáltuk. Ha a toxin a sejtfalat támadja, ez a környezet megvédené a képződő szfero- ill. protoplasztokat a pusztulástól. 10^6 érzékeny sejtet 1 M KCl, illetve 1 M szorbitol jelenlétében kezeltünk aktív toxinnal 24 órán keresztül, majd áramlási citometriás méréssel (PI) vizsgáltuk a protoplasztok viabilitását.

3. 4. 22. 8. Toxin azonosítása, tisztítása

3. 4. 22. 8. 1. Toxin méretének meghatározása

A toxin méretét Ultrafree-MC (Millipore) membránszűrők segítségével becsültük meg. A mintákat 30, 50, és 100 kDa-os szűrőkön centrifugáltuk a gyártó utasításai szerint. Ezután a szűrőn fennmaradó és áthaladó frakciókat kiegészítettük eredeti térfogatra, majd aktivitásukat biotesztben mértük.

3. 4. 22. 8. 2. Fehérje koncentrálási eljárások

A fermentlevek betöményítésére több módszert is alkalmaztunk. Az első a fagyasztva szárítás (liofilezés) volt, melynek során a lefagyasztott fermentlevet liofilizáló berendezésben vákuum alatt részlegesen víztelenítettünk. A módszer során a fermentlé megtartja aktivitását. A másik módszer a triklórecetsavas (TCA) kicsapás, melynek során a fermentlevet négyszeres térfogatú triklórecetsavval csaptuk ki -20ºC-on egy éjszakán át, majd a 10 percig 15000 rpm-mel lecentrifugált fehérje pelletet kétszer mostuk acetonnal, végül a beszárított pelletet 100 mM Tris-HCl-ban vettük fel. A TCA-val kicsapott fehérje aktivitás vizsgálatra nem alkalmas, mert inaktiválódik. Etanollal kicsapott fermentlé esetén biológialig aktív mintát sikerült előállítani. Fehérje szűrőket (Millipore) alkalmazva nemcsak különböző méretű fehérjéket tudtunk frakcionálni, hanem a szűrő áteresztőképességénél nagyobb méretű fehérjéket be is tudtuk koncentrálni, majd az oszlopot megfordítva és lencentrifugálva visszanyertük a koncentrálódott fermentlevet.

3. 4. 22. 8. 3. SDS gélelektroforézis

A vizsgálandó fermentleveket betöményítést követően 70°C-on 10 percig inkubáltuk 5 µl LDS minta felvivőpuffer jelenlétében, majd 5 percre jégre raktuk. Ezután NuPAGE BisTris (4-12%) grádiens gélen választottuk el a fehérjéket NuPAGE MOPS SDS puffer jelenlétében. A gélelektroforézis paraméterei: feszültség: 200 V, kezdeti áramerősség: 110-115 mA, végső áramerősség: 60-70 mA, futási idő: ≈50 perc. A géleket Coomassie Brillant Blue festékkel festettük egy éjszakán át, vagy ezüst festést alkalmaztunk, melynek jóval nagyobb az érzékenysége.

3. 4. 22. 8. 4. Natív gélelektroforézis (Kevei és mtsi, 1999)

A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) során bifunkcionális N,N‘-metilénbisz-akrilamiddal keresztkötött akrilamid polimerek által létrehozott gélben futtatjuk a fehérje mintáinkat. A polimerizáció szabadgyökök jelenlétében zajlik le, melyet általában ammónium perszulfát (APS) szolgáltat, és TEMED (N,N,N‘,N‘-tetrametiletiléndiamin) stabilizál a láncreakció során. A gél pórusméretét a polimerek hossza, és a keresztkötések száma határozza meg. Ezeket a tulajdonságokat az akrilamid koncentrációjával és az akrilamid-bisz-akrilamid arányának megválasztásával befolyásoljuk. A natív gélelektroforézist poliakrilamid gélen végeztük, 3%-os gyűjtő- (stacking) és 7,5%-os szeparálógélekkel. Az elválasztás rövid előfuttatás után (15 perc, 200 V) állandó feszültség mellett történt BioRad PROTEAN®II xi Cell készülékben (Davis, 1964; Vágvölgyi, 1996). A gyűjtőgél eltávolítása után a szeparálógélt az SDS-PAGE módszernél leírt módon festettük, illetve defestettük.

3. 4. 22. 8. 5. Ioncserés kromatográfia (IEC, Bonnerjera és mtsi, 1986)

A különböző kromatográfiák közül a leggyakrabban használt módszer a töltéssel rendelkező biomolekulák szeparálására az ioncserés kromatográfia. A kromatográfiás oszlopok többfélék lehetnek: a Sephadex oszlopok dextrán alapúak, a Sepharose oszlopok (Diethylaminoethyl (DEAE), Carboxymethyl (CM) Sepharose) agaróz alapúak, de vannak keresztkötött cellulóz alapúak is (DEAE Sephacel). A Sephadex megfelel egy alap batch kromatográfiának egy fehérje tisztítása során egy crude mintából (pl: fermentlé), ami különböző szennyező anyagokat (lipidek, sók, stb.) tartalmaz. A módszer alkalmas a nem kívánatos anyagok elszeparálásán kívül koncentrálásra is, így a tisztítás iniciációs lépésének tökéletesen megfelel. A további tisztítást anion- (DEAE Sepharose) vagy kationcserélő (CM Sepharose) oszlopon végeztük. A fehérjék töltése függ a pH-tól, egy fehérjének az izoelektromos pontján (pI) nincs töltése, alatta pozitív, ekkor kationcserélő, felette negatív, ekkor anioncserélő oszlopot használunk. Első lépésben az ioncserélőt ekvilibráltuk adott pH-jú citrát-foszfát pufferrel. Második lépcsőben a minta felvitele és adszorpciója történt meg. A nem kötött anyagokat kezdő pufferrel mostuk le. A harmadik lépcsőben a megkötött molekulákat eluáltuk le az ioncserélőről növekvő sókoncentráció (0,05 M; 0,5 M; 1 M NaCl) segítségével. A szedett frakciók aktivitását agar diffúziós módszerrel vizsgáltuk, majd TCA kicsapást követően SDS-PAGE után vizualizáltuk az aktív frakciókban jelenlévő fehérjéket.

3. 4. 22. 8. 6. Affinitás kromatográfia (Hutchins és Bussey, 1983)

0,7 g epoxi-aktivált sepharose 6B agarózt 2 ml steril desztillált vízben vettünk fel, majd G3-as szinterüveg-szűrön 300 ml steril desztillált vízzel mostuk. 55 mg pusztulánt 4 ml 0,1 M NaOH-ban oldottunk fel. A sepharose-t és a pusztulánt tartalmazó oldatokat összkevertük, majd 45°C-on 2 napig lassan rázattuk. A fennmaradó aktív csoportokat 1 M etanolaminnal gátoltuk le 50°C-on 25 ml-ben egy éjszakán át. A felesleges ligandokat eltávolítandó, a gélt háromszor mostuk felváltva 100-100 ml 0,1 M NaOH-dal, desztillált vízzel, 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8 + 0,5 M NaCl-dal, majd 0,1 M acetát puffer pH 4 + 0,1 M NaCl-dal. A pusztulánnal kapcsolt sepharose 6B gélt oszlopba töltöttük, majd 20 ml 0,1 M citrát-foszfát pufferrel (pH 4,2) ekvilibráltuk az oszloptöltetet. 10-15 ml fermentlevet keringettük az oszlopon 2 órán át perisztaltikus pumpával. 0,1 M citrát-foszfát pufferrel (pH 4,2) történő mosást követően növekvő pH-jú (pH 4,2-4,4-4,6-4,8-5,0) 1,5 M NaCl-dal kiegészített citrát-foszfát pufferrel eluáltunk, amit 2 M urea (pH 4) + 1,5 M NaCl-dal és 7,5% tritonX-100 (pH 4)+1,5 M NaCl-dal történő eluálás követett. A frakciók aktivitását lyuktesztben ellenőriztük.

3. 4. 22. 7. 7. Toxint nem termelő mutánsok előállítása UV mutagenezissel

Pichia anomala egynapos tenyészetéből 10^6 sejtet UV-fénnyel besugároztunk 40 illetve 60 másodperces dózisokban, majd 50-50 µl-t szélesztettünk YPD táptalajra 3 párhuzamosban. A csészéket 20°C-on inkubáltuk 5 napon keresztül. A túlélő telepeket átreplikáztuk érzékeny törzsekkel masszívan oltott YPD4 táptalajra. A gátlási zónát ki nem alakító telepeket tisztítottuk és átoltásokkal ellenőriztük stabilitásukat, majd fermentlevet állítottunk elő belőlük.

4. Eredmények és értékelésük

4. 1. Candida albicans klinikai izolátumok vizsgálata

Magyarországon a *Candida* fertőzések 80%-ért a *Candida albicans* felelős (Dóczi és mtsi, 2002). Újabb vizsgálatok szerint 2003-ban a *Candida* fertőzések 48,7%-áért e faj volt felelős (Messer és mtsi, 2006), míg néhány régióban (Ausztria: Presterl és mtsi, 2007; Norvégia: Sandven és mtsi, 2006) 60-70%-os az előfordulásuk.

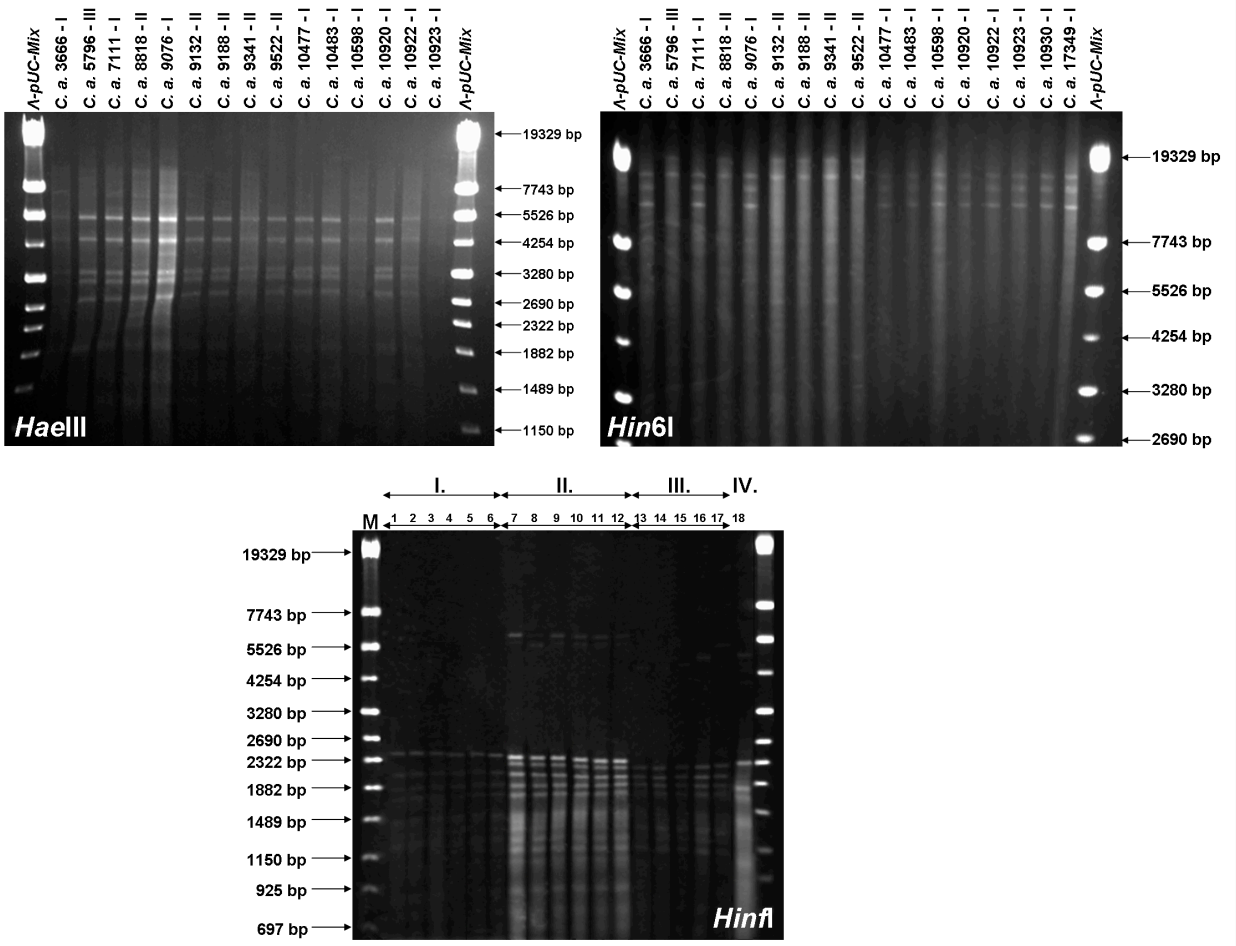
A 2004-2005-ös években egy debreceni kórházban 103 *Candida* izolátumot gyűjtöttek be, amiből 44 (42,7%) bizonyult *C. albicans*-nak, morfológiai és fiziológiai kritériumok alapján (Barnett és mtsi, 2000). Az eredményeket egy *C. albicans* specifikus primerpárral (Luo és Mitchell, 2002) történő PCR teszt is alátamasztotta. Az izolátumokat az 1. táblázatban foglaltuk össze, ahol feltüntettük az eredetüket, valamint a mintát szolgáltató betegek nem- és életkoreloszlását.

4. 1. 1. *C. albicans* klinikai izolátumok mtDNS polimorfizmus vizsgálata

A 44 *C. albicans* izolátumból totál DNS-t izoláltunk, melyeket felhasználva a törzsek mtDNS-RFLP mintázatát vizsgáltuk. A totál DNS-t négy nukleotid felismerőhelyes enzimekkel, *Hae*III-mal, *Hha*I-gyel és *Hinf*I-gyel emésztve a magas GC-tartalmú nukleáris DNS kis méretű fragmentumokra hasad, ami a futtatás során kifut a gélből, míg az AT-gazdag mtDNS mintázata előtérbe kerül. Futtatást követően a *Hae*III emésztés esetén azonos mintázatot tapasztaltunk, *Hin*6I emésztés esetén kettő, míg *Hinf*I emésztés során négy RFLP mintázatot tudtunk elkülöníteni (2. ábra), ez alapján négy csopotra osztottuk fel az izolátumokat. A legtöbb izolátumot, számszerint 23-at, tartalmazó csoportot I. típusként jelöljük, a II. és III. típus megközelítőleg azonos számú izolátumot foglal magában, 11-et illetve 9-et, míg a IV. csoportot mindössze 1 izolátum képviseli (1. táblázat).

1. táblázat: *Candida albicans* klinikai izolátumok

Törzsszám	Eredet	MtDNS típus	Nem	Életkor (év)
C. albicans 1900	hemokultúra	I	férfi	55
C. albicans 3666	hemokultúra	I.	férfi	47
C. albicans 4044	hemokultúra	I.	férfi	21
C. albicans 7111	hemokultúra	I.	nő	53
C. albicans 7113	hemokultúra	I.	nő	53
C. albicans 9076	hemokultúra	I.	nő	75
C. albicans 10477	hemokultúra	I.	férfi	77
C. albicans 10483	hemokultúra	I.	férfi	82
C. albicans 10485	hemokultúra	I.	férfi	77
C. albicans 10598	hemokultúra	I.	férfi	58
C. albicans 10920	hemokultúra	I.	nő	44
C. albicans 10922	hemokultúra	I.	nő	44
C. albicans 10923	hemokultúra	I.	nő	44
C. albicans 10926	hemokultúra	I.	férfi	82
C. albicans 10928	hemokultúra	I.	férfi	82
C. albicans 10930	hemokultúra	I.	férfi	82
C. albicans 11272	hemokultúra	I.	nő	26
C. albicans 12171	vizelet	I.	nő	66
C. albicans 13092	hemokultúra	I.	férfi	3
C. albicans 13115	hemokultúra	I.	férfi	81
C. albicans 17349	hemokultúra	I.	férfi	35
C. albicans 21186	hemokultúra	I.	férfi	50
C. albicans 23745	hemokultúra	I.	nő	71
C. albicans 8818	hemokultúra	II.	nő	41
C. albicans 9054	hemokultúra	II.	nő	2
C. albicans 9132	hemokultúra	II.	nő	2
C. albicans 9188	hemokultúra	II.	nő	2
C. albicans 9341	hemokultúra	II.	nő	2
C. albicans 9522	hemokultúra	II.	nő	2
C. albicans 16053	hemokultúra	II.	nő	1
C. albicans 17905	hemokultúra	II.	nő	31
C. albicans 19368	hemokultúra	II.	nő	31
C. albicans 19370	hemokultúra	II.	nő	31
C. albicans 19372	hemokultúra	II.	nő	31
C. albicans 4780	hemokultúra	III.	nő	41
C. albicans 4782	hemokultúra	III.	nő	41
C. albicans 5796	hemokultúra	III.	férfi	10 hónap
C. albicans 8812	hemokultúra	III.	férfi	42
C. albicans 19175	hemokultúra	III.	nő	58
C. albicans 19179	hemokultúra	III.	nő	58
C. albicans 19321	hemokultúra	III.	nő	58
C. albicans 19627	hemokultúra	III.	férfi	34
C. albicans 19888	hemokultúra	III.	nő	58
C. albicans 17471	hemokultúra	IV.	férfi	73

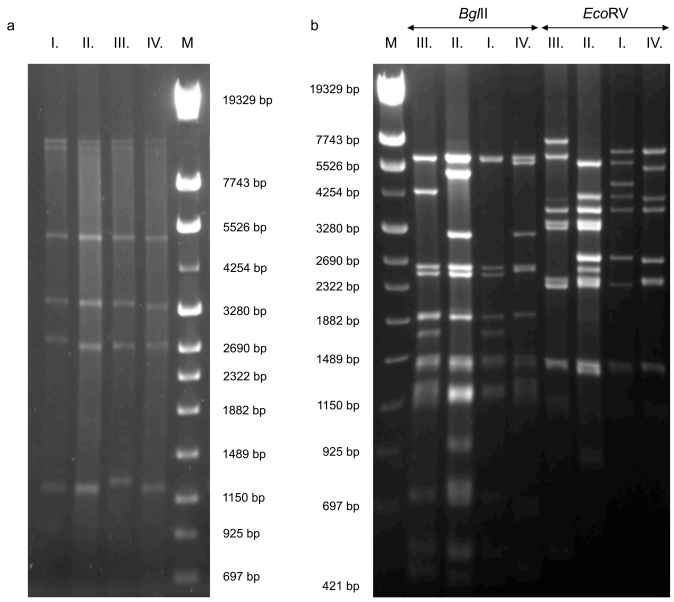


2. ábra: *C. albicans* izolátumok *Hae*III, *Hin*6I és *Hinf*I-emésztett totál DNS-e. Jelzések: M: λ-pUC Mix; 1: 10477; 2: 10483; 3: 10598; 4: 10922; 5: 10923; 6: 10930; 7: 9132; 8: 16053; 9: 17905; 10: 19368; 11: 19370; 12: 19372; 13: 4780; 14: 4782; 15: 5796; 16: 8812; 17: 19888; 18: 17471

A csoportok létezésének bizonyítására az I.-II.-III. csoportok esetén kettő-kettő törzsből, illetve az egyedüli, IV. csoportot képező izolátumból mitokondriális DNS-t izoláltunk. A génbankban található *C. albicans* SC5314 törzs (Anderson és mtsi, 2001, génbank hozzáférési szám: AF285261) mtDNS-ének szekvenciáját felhasználva olyan restrikciós enzimeket választottunk ki, melyek számos, de nem túl sok hasítóhellyel rendelkeznek az általunk kontrollként használt SC5314 törzsnél. Elsőként *Pvu*II-vel emésztettük meg a mtDNS-eket, aminek 6 hasítóhelye található meg a SC5314 törzs mtDNS-én. A reprezentáns törzsek (I.: 10930; II.: 9132; III.: 5796; IV.: 17471) azonos mintázatot mutattak, minden típusban 6 fragmentum figyelhető meg, melyek között eltérés nincs, mindössze a 2, egyforma méretű legkisebb fragmentum (amely a repetitív régió része) méretében figyelhető meg egy körülbelül

50 bp eltérés az I., II. és IV. típusok esetén a III. típushoz viszonyítva, melyek mérete így körülbelül 100 bp-ral kisebb a kontrollhoz képest. (3/a. ábra).

Ezt követően frekventáltabban hasító enzimeket választottunk ki, ezek a *Bgl*II és *Eco*RV. Mind a két restrikciós enzimmel jól elkülönülő mintázatot kaptunk (3/b. ábra). Ez megerősítette a négy típus létezését. A fragmentumok méretének meghatározása után a III. típusba tartozó törzs (5796) emésztési képe azonosnak bizonyult a génbankban található SC5314 törzs *in silico* emésztésével, mely törzs mtDNS mérete 40420 bp. A *Pvu*II emésztési kép alapján elmondhatjuk, hogy a klinikai izolátumok mérete körülbelül 40 kb.

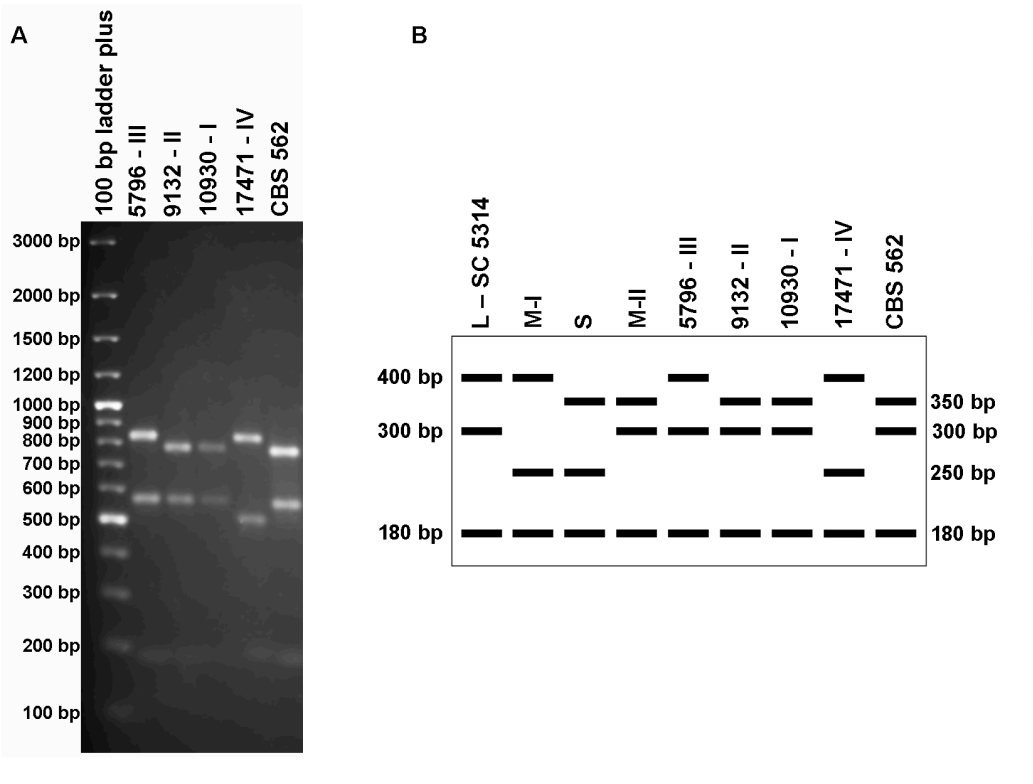


3. ábra: *C. albicans* izolátumok mtDNS RFLP mintázata.
3/a: *Pvu*II-emésztett mtDNS profil
3/b. A négy típus mtDNS-ének *Bgl*II- és *Eco*RV-emésztési képe
M: λ-pUC Mix; III.: 5796; II.: 9132; I.: 10930; IV.: 17471.

Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus hasznos eszköznek bizonyult a *C. albicans* különböző törzseinek a biotipizálására. Totál DNS-t *Hin*fI restrikciós enzimmel emésztve differenciálni lehet a *C. albicans* patogén törzseit, ugyanez igaz izolált mtDNS *Bgl*II és *Eco*RV enzimekkel történő emésztésére.

A legkisebb méretű *Pvu*II-es fragmentum méretében tapasztalt változás okának meghatározására primereket terveztünk a környező régióra (8909-10486 nt): CAPvuA frw (5'-CGG ATC GGG TGT AGT GGA GG -3') és CAPvuA rev (5'- CGT GGA CTT AAC CAA GGA -3')). Az 5796 (III) és 9132 (II) törzs templát DNS-éről átírt PCR termékeket megszekvenáltattuk. A szekvencia adatok alapján egy 55 bp deléciót detektáltunk a II. típusban a III. típushoz képest,

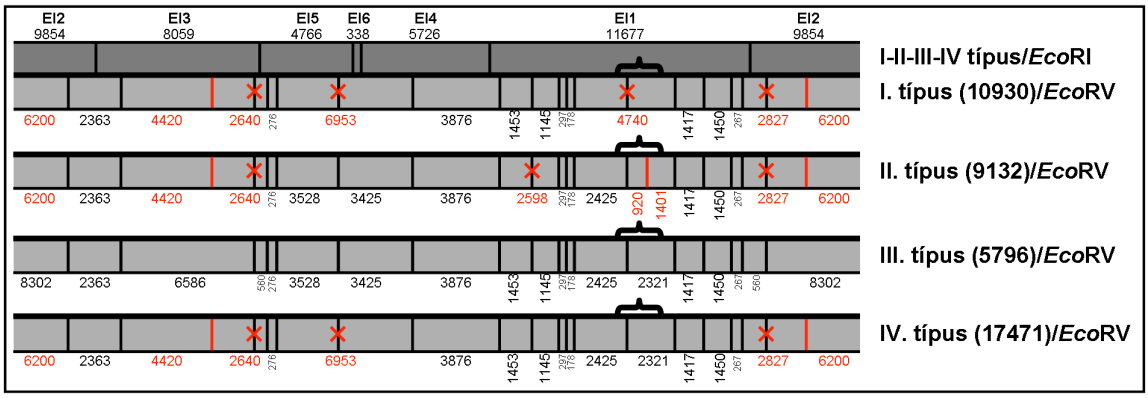
a *cox3* gént megelező intergénikus régióban. Ez a *Pvu*II fragmentum tartalmazza a már korábban leírt EO3 régiót (Miyakawa és mtsi, 1992, 1994), mely egy *C. albicans* fajspecifikus DNS szakasz a mtDNS repeat régiójában (9071-9954 nt tartomány az SC5314 törzsben). Ez a régió polimorfizmust mutat, aminek oka két rövid, kb. 50 nt méretű szegmens (A és B) megléte vagy hiánya. Miyakawa és munkatársai 2008-ben négy típus meglétét írták le: az L tartalmazza az A és B szegmenst is, az MI csak az A-t, az MII csak a B-t, míg az S típus egyiket sem, ezt RFLP analízissel is alátámasztották *Bgl*II hasítási mintázat alapján. Az EO3 régiót, illetve magukat a szegmenseket és a *Bgl*II hasítóhelyeket is inverted repeat (IR) szekvenciák övezik, amik a szekvencia polimorfizmus generálásban játszanak nagy valószínűséggel szerepet. Mindezek a tények alátámasztják az EO3 tipizálás epidemiológiai hasznosságát. Az általunk amplifikált régió hasítási képe (4/A. ábra) alapján elkészítettük Miyakawa és munkatársai által leírt EO3 régióra vetítve az L, MI, MII, S típusok, valamint az általunk vizsgált reprezentáns törzsek sematikus RFLP képét (4/B. ábra) *Bgl*II enzimet felhasználva. A klinikai izolátumok négy fő típusát sikerült beazonosítani a Miyakawa és munkatársai által létrehozott csoportokba: az 5796 (III) az L, a 9132 (II) és 10930 (I) az MII, míg a 17471 (IV) MI csoportba tartozik (4/B. ábra). Az új *C. albicans* típustörzs, a CBS 562 az MII csoport mintázatát mutatja. Az általunk vizsgált *C. albicans* populáció egyik tagja sem mutatott azonos képet az S típussal. Szekvencia adatok alapján a 9132 és 10930 törzs ezen régiója az A szegmenst (génbank szám: 5796 törzs GU395655 és GU395657, 9132 törzs GU395656 és GU395658), a 17471 törzs pedig a B szegmenst tartalmazza, épp fordítva, mint ahogy azt az RFLP képük alapján történő besorolásuk követelné.



4. ábra: *C. albicans* izolátumok EO3 régiójának vizsgálata
4/A: Klinikai izolátumok legkisebb *Pvu*II-es mtDNS fragmentumának PCR-RFLP képe *Bgl*II enzimmel hasítva
4/B: EO3 régió PCR-RFLP vizsgálata a leírt típusok mellett a klinikai izolátumok 4/A képéből számított fragmentum méretekkel

4. 1. 2. *C. albicans* klinikai izolátumok fizikai térképezése

Elkészítettük az általunk elkülönített négy típus egy-egy reprezentáns törzs (I.: 10930; II.: 9132; III.: 5796; IV.: 17471) mitokondriális DNS-ének fizikai térképét *Eco*RI-*Eco*RV enzimeket felhasználva. Mivel a négy típus *Eco*RI emésztési képe azonos mintázatot mutatott (6 fragmentum), ezeket a fragmentumokat pBluescript SK vektorba klónoztuk. A tisztított plazmidokat *Eco*RI-*Eco*RV kettős emésztettük és mértük a kapott fragmentumok méretét. Mivel a III. típusba tartozó 5796 törzs *Eco*RV és *Bgl*II emésztési képe megegyezik a génbankban található SC5314 törzs *in silico* emésztésével, ezért annak fizikai térképét vettük (5. ábra) alapul a többi típus vizsgálatához.

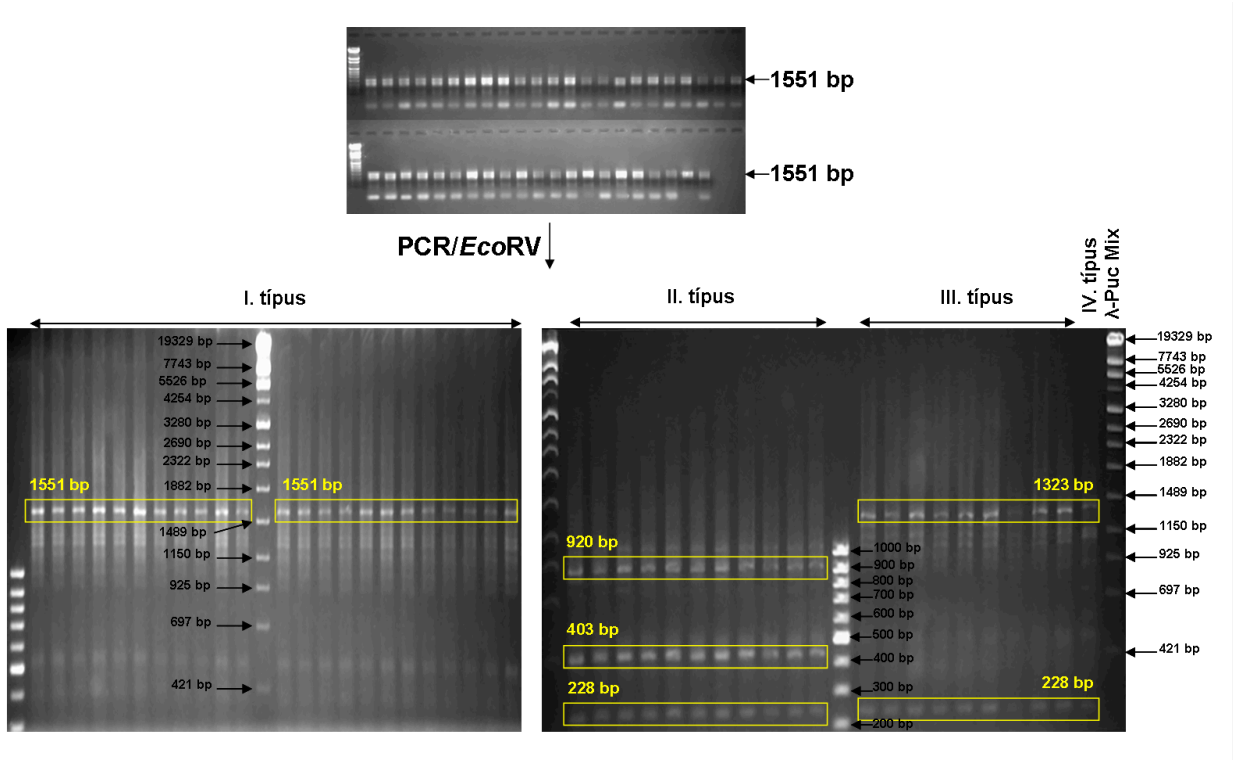


5. ábra: A négy típusba tartozó *C. albicans* törzs mtDNS-ének *Eco*RI-*Eco*RV fizikai térképe. Az ábrán pirossal jelöltük a SC 5314-es mtDNShez viszonyított változások helyét. A kapcsos zárójel a FZRV régiót jelzi.

A típusoknál tapasztalt hasítóhely-eltéréseket a térképeken pirossal jelöltük, ahol *Eco*RV hasítóhely jött létre azt piros vonallal, ahol hasítóhely tűnt el azt piros kereszttel. A meglévő klónokat T3, illetve T7 irányból megszekvenáltattuk (génbank hozzáférési számok: GU395659, GU395660, GU395661, GU395662, GU395663, GU395664, GU395665, GU395666 és GU395667), és azt tapasztaltuk, hogy a hasítóhelyekben történt változásokért a felismerőhelyben bekövetkezett pontmutációk a felelősek (pl.: GAT/ATC helyett GGT/ATC, azaz A→G tranzíció).

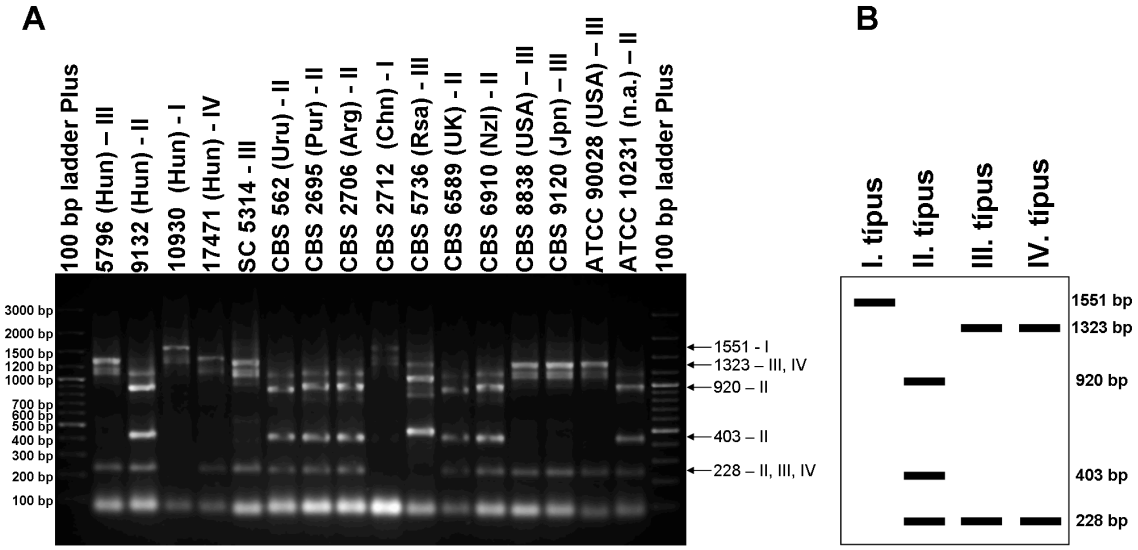
4. 1. 3. *C. albicans* klinikai izolátumok differenciálása

Az eddigi vizsgálatok során csak a típusok egy-egy reprezentáns törzsével dolgoztunk. A többi klinikai izolátum helyes besorolásának igazolására a térképeket alapul véve kiválasztottunk egy olyan régiót, amely mind a négy típusban eltérést mutat. Ez a régió az *Eco*RI 1.-es fragmentumon található, tartalmazza a *srRNS* gén végszekvenciáját, intergénikus szekvenciát és a teljes *nad4l* gént (28321 bp-29888 bp). Az SC 5314-es törzs szekvenciája alapján a régió köré primer-párt terveztünk, amikkel a 44 izolátum totál DNS-éről felszaporítottuk az adott szakaszt (FZRV régió: 1551 bp). Ezt követően a PCR termékeket *Eco*RV-tel emésztve vizsgáltuk a törzsek PCR-RFLP képét (6. ábra). Az összes izolátum a besorolásának megfelelő mintázatot mutatta (I. nincs hasítóhely - 1551 bp; II. két hasítóhely - 920 bp, 403 bp, 228 bp; III. egy hasítóhely - 1323 bp, 228 bp; IV. egy hasítóhely - 1323 bp, 228 bp). A IV. típusba csak egy izolátum (17471) tartozik, amely e régió PCR-RFLP alapján nem különbözik a III. típustól.



6. ábra: *C. albicans* izolátumok FZRV régiójának PCR-RFLP képe

További mtNDS RFLP típusok elkülönítésére különböző földrajzi helyekről származó, törzsgyűjteményes *C. albicans* izolátumokat vizsgáltunk meg ennek a régiónak a PCR-RFLP képére nézve. Eredményeink alapján az SC 5314 törzs a III. típusnak megfelelő mintázatot adott, a *C. albicans* új típustörzse, a CBS 562 valamint az ATCC 10231 a II. típusba tartozik. A PCR RFLP kép *Eco*RV enzimet használva nem elkülönülő a III.-IV. csoportok esetén, de a PCR terméket *Bgl*II-vel emésztve a III. típus eltérőnek bizonyul a IV. típustól. A magyar izolátumok közötti leggyakoribb I. típust csak a kínai izolátum képviseli, a dél-amerikai, egyesült királyságbeli, új-zélandi izolátumok a II. típusba, az észak-amerikai és japán izolátumok a III. típusba tartoznak. A dél-afrikai izolátum PCR RFLP mintázata *Eco*RV enzimet használva nem sorolható be a négy csoport egyikébe sem, de *Bgl*II-vel a III. típussal hasonló képet kapunk. A legritkább IV. típusnak az általunk vizsgált izolátumok egyike sem feleltethető meg (7. ábra).

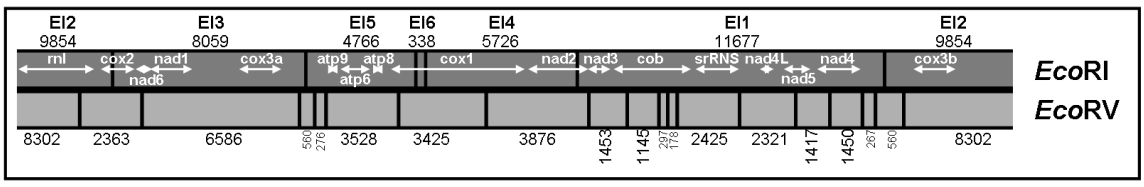


7/A. ábra: Törzsgyűjteményes *C. albicans* törzsek PCR-RFLP képe a reprezentáns klinikai izolátumok mellett, *Eco*RV enzimmel emésztve
7/B. ábra: mtDNS típusok PCR RFLP képe a FZRV régióra *Eco*RV enzimmel emésztve

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az általunk kiválasztott FZRV régió vizsgálata PCR-RFLP módszerrel jó tipizálási és csoportosítási módszernek bizonyul a már létező EO3 tipizálás mellett.

4. 1. 4. A mtDNS típusok parciális géntérképének elkészítése

A génbankban megtalálható *C. albicans* SC5314-es törzsének génjeihez írt specifikus primerekkel homológ génpróbákat állítottunk elő, a következő génekre nézve: *cox1, cox2, cox3, cob, nad1, nad2, nad4, nad5* és *atp6*. A négy típus *Eco*RI, *Eco*RI-*Eco*RV és *Eco*RV emésztett izolált mtDNS fragmentumjait tartalmazó gélről átblottolt filterekkel hibridizációs kísérleteket végeztünk el, melyek során az SC 5314-es törzzsel megegyező génsorrendet állapítottunk meg mind a négy típusban (8. ábra).

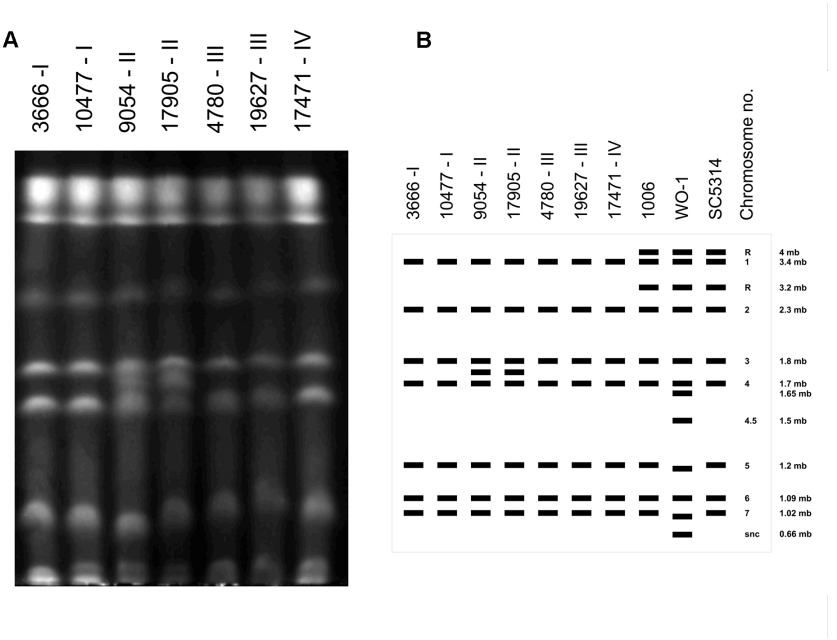


8. ábra: Az SC 5314-es törzs mtDNS géntérképe

Vizsgálataink azt mutatják, hogy a mtDNS polimorfizmusért a hasítóhelyekben bekövetkezett pontmutációk, illetve kisebb deléciók-inszerciók a felelősek, melyek a génsorrendet nem befolyásolják. Rekombinációs eseményeket nem tudtunk kimutatni.

4. 1. 5. Pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE)

A klinikai *C. albicans* izolátumok I., II., III. típusának 2-2 törzséből (I.: 3666, 10477; II.: 9054, 17905; III.: 4780, 19627), illetve a IV. típus egyedüli törzséből (17471) protoplasztokat állítottunk elő, melyekből agaróz gél blokkba ágyazott kromoszómális DNS preparátumot készítettünk. A kromoszómális DNS-t CHEF-DR™ II készülékben szeparáltuk (9/A. ábra).

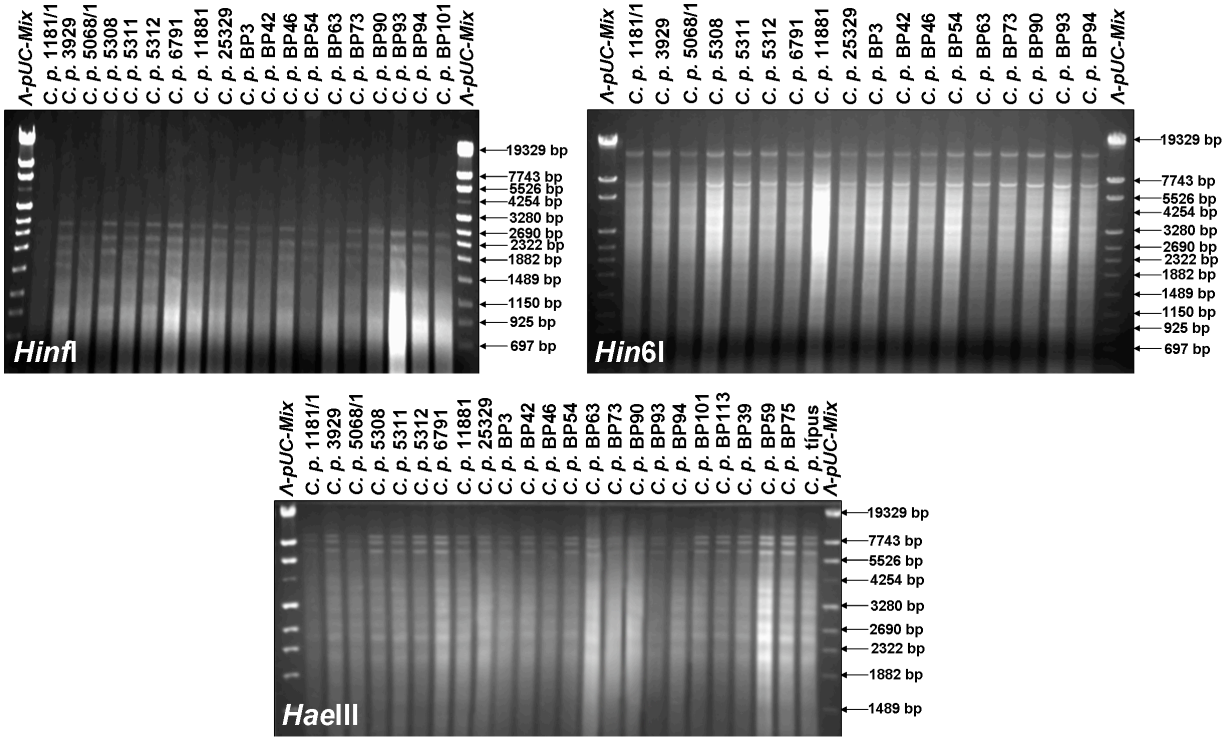


9/A. ábra: *C. albicans* reprezentáns törzseinek elektroforetikus kariotípus mintázata
9/B. ábra: A reprezentáns klinikai *C. albicans* törzsek, illetve a 1006, WO-1 és SC5314 törzsgyűjteményes törzsek kariotípusának sematikus képe (snc-supernumerary chromosome=számfeletti kromoszóma)

A mtDNS mintázat alapján elkülönített négy típus elektroforetikus kariotípus képe az I., III. és IV. típus esetén megegyezik a *C. albicans* 1006 törzsével, míg a II. típus egy plusz kromoszóma sávot tartalmaz (9/B. ábra), ami 3. és 4. kromoszóma között helyezkedik el (1.8 Mb és 1.7 Mb). A *C. albicans* WO-1 törzse szintén hordoz egy extra kromoszómát a 1006 törzshöz képest, de annak mérete (1,65 Mb) különbözik a II. típusnál megfigyelttől. A *C. albicans* fizikai térképének weblap címe: http://albicansmap.ahc.umn.edu/.

4. 2. C. parapsilosis klinikai izolátumok vizsgálata

A *C. albicans* mellett humán vonatkozását tekintve az egyik legnagyobb jelentőséggel bíró patogén élesztőgomba, a filogenetikailag azonos kládba tartozó *C. parapsilosis,* ami embernél leggyakrabban bőr- és körömmegbetegedéseket okoz. A *C. parapsilosis* csoport 3 fajt foglal magában: *C. parapsilosis* (I. szubtípus), *C. orthopsilosis* (II. szubtípus) és *C. metapsilosis* (III. szubtípus). A szakirodalom (Su és Meyer, 1989, 1991; Roy és Meyer, 1998) különböző *C. parapsilosis*-izolátumokkal kapcsolatban mitokondriális DNS polimorfizmust írt le. Kísérleteink során 23 klinikai izolátum RFLP képét vizsgáltunk meg, melyek a debreceni egyetemről származtak. Eredményeink eltértek a korábban a szakirodalomban közölt adatoktól, minden izolátum esetében azonos RFLP mintázatot kaptunk (10. ábra).

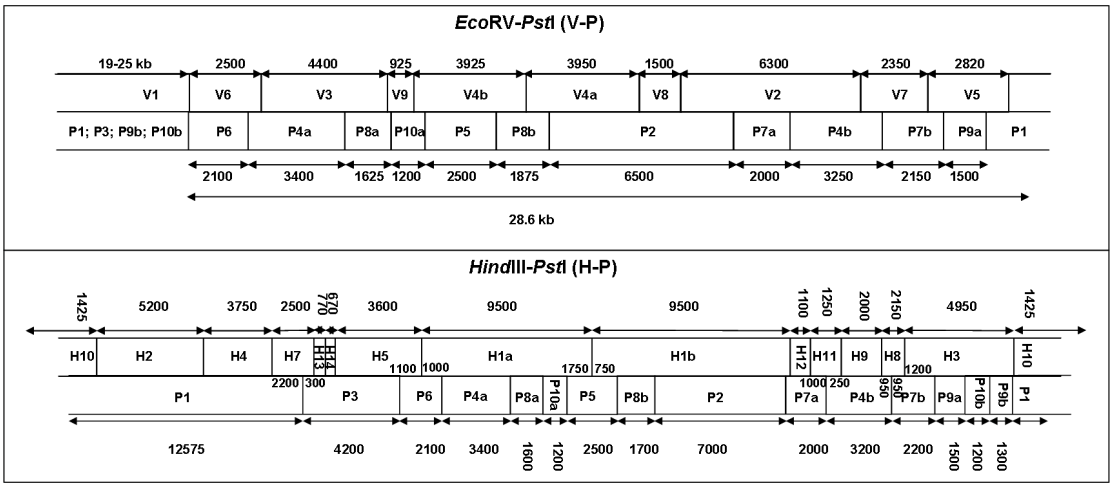


10. ábra: *C. parapsilosis* izolátumok RFLP mintázata *Hinf*I, *Hin*6I és *Hae*III enzimekre nézve

A korábban leírt eltérő RFLP mintázatok oka az akkor még *C. parapsilosis* szubtípusokként leírt, ma már külön fajként kezelt *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* fajoknak a *C. parapsilosis sensu stricto*-tól elkülönülő RFLP képe, mely konzervált restrikciós fragmentum profilt mutat (Kosa és mtsi, 2006).

4. 3. Candida maltosa CBS 5611 törzs mtDNS restrikciós elemzése, térképezése

Egy nemzetközi projekt a *C. albicans* kládba (Diezmann és mtsi, 2004) tartozó fajok (*C. albicans, C. parapsilosis, C. metapsilosis, C. orthopsilos*, *C. tropicalis, C. dubliniensis, C. sojae, C. maltosa*) taxonómiai kapcsolatainak és a mitokondriális genom eredetének vizsgálatára irányul. Ehhez az ebbe a kládba tartozó fajok mtDNS-ének szekvencia-szintű ismerete szükséges. Munkám során a klád egyik apatogén, imperfekt, szénhidrogén-asszimiláló fajának, a *C. maltosa* mtDNS-ének vizsgálatát végeztem el. Első lépésben elkészítettük a mtDNS *Eco*RV-*Pst*I, illetve *Hind*III-*Pst*I restrikciós térképét (11. ábra).



11. ábra: *C. maltosa Eco*RV-*Pst*I, valamint *Hind*III-*Pst*I restrikciós térképe

A pozsonyi Comenius Egyetem Biokémiai Tanszékével kooperációban megtörtént a *C. maltosa* mtDNS-ének szekvencia szintű meghatározása. Az izolált mtDNS-t mechanikusan törtük, a fragmentumokat vektorba ligáltuk, majd random szekvenálását végeztük, T3, illetve T7 szekvenáló primerekkel. A szekvenciákat számítógépes szoftver segítségével rendeztük össze átfedő régiók alapján, az elkészített restrikciós térképek segítségével. A fennmaradó „szekvencia-rések" (gap-ek) feltöltése primer walking technikával történt. A *C. maltosa* CBS 5611 törzs mitokondriális DNS-e 62949 bp méretűnek és cirkuláris konformációjúnak bizonyult. A mt genom a standard mitokondriális génkészletet hordozza: *atp*6-8-9, *cox*1-2-3, *cob*, *nad1-2-3-4-4L-5-6, SSUrRNS, LSUrRNS*, illetve 26 db tRNS. A gének közül 3-ban található 2-2 intron: a *cox*1, *cob* és *rnl*. A mitokondriális genom két repeat régiót tartalmaz: direkt szálon a 12859-27237 bp szakasz, illetve a komplementer szálon a 40937-55315 bp szakasz, melyek kódoló régiót nem

tartalmaznak. Ezen repeat régiók, illetve az intronok jelenléte is hozzájárul a viszonylagosan nagy genom mérethez.

4. 4. Mitokondriális intronok vizsgálata

Az intronok vizsgálata alapul szolgálhat további tipizálási módszerek kidolgozásához, hiszen azok megléte, illetve hiánya és különböző méretük lehetővé teszi az őket övező exon szekvenciákra írt primerek segítségével fajspecifikus PCR termékek előállítását. A *C. albicans* klád 14 vizsgált törzse és a külcsoportként használt *D. hanseniaspora* közül csak a *L. elongisporus* bizonyult intron mentesnek (1. melléklet). Az intronok száma és azok mérete nincs korrelációban a teljes mitokondriális genom mérettel. Négy gén, nevezetesen a *cox*1, *cob*, *rnl* és a *nad5* génje tartalmaz intront, amelyek többsége I. típusú intron, II. típus csak négy esetben volt jelen. Az intron-inszercióknál található jellegzetes szekvenciarészletek (Langkjaer, 2003) összefoglaló táblázata az 5. mellékletben található.

A *nad*5 gén csak a *C. neerlandica* és *C. viswanathii* törzsekben tartalmaz intront (2. melléklet), a következtetett aminosav szekvencia alapján a *Cn*N5.I1 intron LAGLI-DADG motívumot tartalmaz, míg a *Cv*N5.I1 ORF-je nem mutat jellegzetes motívumot, de nukleotidszekvencia szinten mutatott homológia alapján feltételezhető a közös eredet.

Az *rnl* génben (2. melléklet) intront tartalmazó törzsek: *C. neerlandica*, *C. maltosa, C. parapsilosis*, *C. albicans* és *C. dubliniensis*. A következő intronokban nem található konzervált motívum: *Cma*LSU.I1, $Cp_{CLIB214}$LSU.I1, Cp_{SR23}LSU.I1, *Ca*LSU.I1 és *Cd*LSU.I1. A *Cn*LSU.I1, *Cma*LSU.I2, $Cp_{CLIB214}$LSU.I2 és Cp_{SR23}LSU.I2 nem tartalmaz ORF-t, míg az ORF-et tartalmazó *Ca*LSU.I2 és *Cd*LSU.I2 motívum-mentes. A $Cp_{CLIB214}$LSU.I1 és Cp_{SR23}LSU.I1 valamint a $Cp_{CLIB214}$LSU.I2 és Cp_{SR23}LSU.I2 100% szekvencia homológiát mutat. A *Saccharomyces cerevisiae* jól ismert ω intronjával nem találtunk homológiát.

A *cob* gén (3. melléklet) esetén a *C. sojae* és *C. tropicalis* intron-mentes, a többi törzs esetén két konzervatív pozíciót azonosítottunk intron inszerció előnyben részesített helyeként. Az első a 131. és 132. aminósav közötti, ahol a *C. albicans* (*Ca*COB.I1), *C. metapsilosis* (Cme_{MCO488}COB.I1, Cme_{PL48}COB.I1), *C. parapsilosis* ($Cp_{CLIB214}$COB.I1, Cp_{SR23}COB.I1), *C. maltosa* (*Cma*COB.I1) és *D. hansenii* (*Dh*COB.I1) tartalmaz GIY-YIG motívumot mutató intront, illetve a *C. neerlandica* (*Cn*COB.I1) motívum-nélkülit. A második pozícióban LAGLI-DADG motívumot mutató intronok találhatóak *C. orthopsilosis* (Co_{MCO456}COB.I1, Co_{MCO471}COB.I1), *C. parapsilosis* ($Cp_{CLIB214}$COB.I2, Cp_{SR23}COB.I2) és *D. hansenii* (*Dh*COB.I2)

esetén, míg *C. albicans* (*Ca*COB.I2) esetén nincs ORF, *C. dubliniensis*-ben (*Cd*COB.I1) lévőben pedig motívum nélküli az ORF. A *C. neerlandica cob* génje ezen kívül két intront tartalmaz: a motívum nélküli *Cn*COB.I2 és a LAGLI-DADG motívumot mutató *Cn*COB.I3. *C. maltosa* második intronja (*Cma*COB.I2) motívum-mentes, *D. hansenii* harmadik intronja *(Dh*COB.I3) LAGLI-DADG motívumot mutat. *C. viswanathii* egyedüli intronja (*Cv*COB.I1) II. típusú intron, reverz transzkriptázszerű motívumot mutat.

L. elongisporus és a *C. metapsilosis* törzsek nem tartalmaznak intront a *cox*1 génben (4. melléklet). Az intronok előfordulása különböző pozíciókban figyelhető meg, de az azonos pozícióban előforduló intronok ugyanabba a csoportba tartoznak és azonos aminósav-motívumot mutatnak. A *C. albicans* és *C. dubliniensis* törzsek három intront (*Ca*CI.I1, *Ca*CI.I2, *Ca*CI.I3, *Cd*CI.I1, *Cd*CI.I2, *Cd*CI.I3) tartalmaznak azonos pozícióban, azonos LAGLI-DADG motívummal. A szekvencia homológia az azonos pozícióban lévő intronok esetén a következő: 83,6% (*Ca*CI.I1-*Cd*CI.I1), 85% (*Ca*CI.I2-*Cd*CI.I2) és 81% (*Ca*CI.I3-*Cd*CI.I3). *D. hansenii* három intronja (*Dh*CI.I1, *Dh*CI.I2, *Dh*CI.I3) szintén LAGLI-DADG motívumú. Az első és harmadik intron inszerciós pontja megegyezik a *C. albicans* és *C. dubliniensis* első és harmadik intronjának pozíciójával. *C. neerlandica* (*Cn*CI.I1), *C. viswanathii* (*Cv*CI.I1) és *C. tropicalis* (*Ct*CI.I1) első intronjai LAGLI-DADG motívumot mutatnak és inszerciós pontjuk egybeesik a *Ca*CI.I1, *Cd*CI.I1 és *Dh*CI.I1 intronokkal, habár jelentős szekvenciahomológiát nem lehet tapasztalni. *C. neerlandica* (*Cn*CI.I2) és *C. tropicalis* (*Ct*CI.I2) második valamint *C. sojae* (*Cs*CI.I1) és *C. maltosa* (*Cma*CI.I1) első intronja a *Dh*CI.I2-vel azonos pozícióban található, LAGLI-DADG motívummal. *C. maltosa* és *C. sojae* tartalmaz egy második intront (*Cma*CI.I1 és *Cs*CI.I2) is egyedi pozícióban. A *Cma*CI.I1 nem tartalmaz ORF-t, míg a *Cs*CI.I2 II. típusú intronnak bizonyult, mivel maturázt kódol. A *C. parapsilosis* törzsek három intronnal rendelkeznek ($Cp_{CLIB214}$CI.I1, $Cp_{CLIB214}$CI.I2, $Cp_{CLIB214}$CI.I3, Cp_{SR23}CI.I1, Cp_{SR23}CI.I2 és Cp_{SR23}CI.I3). A $Cp_{CLIB214}$CI.I1 és Cp_{SR23}CI.I1 100% szekvenciahomológiát mutató II. típusú intronok (reverz transzkriptázt kódolnak). A *Cp*CI.I2 and *Cp*CI.I3 I. típusú intronok LAGLI-DADG motívummal, a szekvenciahomológia a $Cp_{CLIB214}$CI.I2 és Cp_{SR23}CI.I2 esetén 100%, míg $Cp_{CLIB214}$CI.I3 és Cp_{SR23}CI.I3 esetén 99.9%. A *C. orthopsilosis* MCO471 egy intront (Co_{MCO471}CI.I1) tartalmaz LAGLI-DADG motívummal a *Cp*CI.I3 intronnal azonos pozícióban (szekvenciahomológiája: 89%). A *C. orthopsilosis* MCO471 egy továbbbi intront (Co_{MCO471}CI.I2) tartalmaz, ami 95%-os homológiát mutat a *C. orthopsilosis* MCO456 törzs egyedüli intronjával (Co_{MCO456}CI.I1). Ezek az intronok nem tartalmaznak ORF-t.

A *C. albicans* és *C. parapsilosis* elkülönítésére a *cox*1 génre primer párt tervezünk, melynek forward tagja „degenerált" szekvenciájú *C. albicans*-ra és *C. parapsilosis*-ra, reverz tagja viszont specifikus külön-külön a két fajra nézve. Ezen primerek alkalmazásával el tudjuk különíteni a *C. albicans*-t és a *C. parapsilosis*-t: *C. albicans* esetén egy 1542 bp-os, míg *C. parapsilosis* esetén egy 3269 bp terméket kapunk, aminek az oka az eltérő introntartalom. A *C. parapsilosis* csoport tagjait is el lehet különíteni ezzel a primer párral, ugyanis a *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* klinikai izolátumokban a termék mérete mindössze 400 bp körülinek bizonyult, aminek az oka, hogy az adott pozícióban a *C. parapsilosis*-ban meglévő intron ezekben a fajokban hiányzik.

Két, cob génre írt primer pár (comp cobfrwA: 5'-CGTTACCTGTAATACCTAATGGG-3', comp cobrevA: 5'-GTTTACGGACAAATGTCTCACTGAGG-3'; comp cobfrwB: 5'-CCTCAGTGAGACATTTGTCCGTAAAC-3', comp cobrevB: 5'-GCGTGATGTTAATGCTGGTTG-3') segítségével a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* is elkülöníthető egymástól. *C. parapsilosis* esetén 1410-1408 bp (A) vagy 1596-1664 bp (B), *C. metapsilosis* esetén 196 bp (A) vagy 1605 bp (B), míg *C. orthopsilosis* esetén 1389 bp (A) vagy 181 bp (B) terméket kapunk.

4.5. Pichia anomala VKM Y-159 törzs által termelt killer toxin jellemzése

Biológiai társulásokban az élőlények az élettér benépesítéséért ill. tápanyagokhoz való hozzájutásért folytatott kompetíció során különböző eszközöket fejlesztettek ki a versenytársak elpusztítására. Ilyen eszközök lehetnek a gombák specifikus ill. nem specifikus hatású extracelluláris toxinjai vagy enzimei. Előbbiek közé tartoznak az általában a termelő törzzsel közeli rokonságban álló fajokat pusztító killer toxinok. Néhány esetben a killer toxin szélesebb hatásspektrumú, nem-rokon fajok esetében is aktív. Ezek közt vannak humán patogén élesztőgombák ellen is hatásos toxinok (Polonelli és mtsi, 1986).

Munkánk során egy killer toxint termelő *Pichia anomala* törzs (VKM Y-159) toxinjának jellemzését végeztük el. A *P. anomala* az aszkuszos gombákok belül a *Saccharomycetes* oszály *Saccharomycetales* rendjének *Saccharomycetaceae* családjába tartozó élesztőgomba, melynek toxintermelő törzseiről a szakirodalomban is olvashatunk (Sawant és mtsi, 1988; Izgü és mtsi, 2006).

4. 5. 1. Hatásspektrum-vizsgálat

Egy-egy toxin specificitása, hatásspektruma meghatározó tulajdonsága az adott toxinnak. Kutatásaink során az általunk vizsgált *P. anomala* törzs killer toxinját különböző élesztőgomba törzsek ellen teszteltük, a törzsek toxinnal szembeni érzékenységét a 2. táblázatban foglaltuk össze. A toxin a különböző *Candida* fajok ellen eltérő antagonista hatású: *C. norvegica*, *C. tropicalis* és *C. guilliermondii* esetén a gátlási zóna széles, ezek a fajok bizonyultak a legérzékenyebbnek. *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. inconspicua, C. lypolitica, C. viswanathii* kevésbé bizonyult érzékenynek a toxinnal szemben, de még mindig jelentős növekedés gátlás figyelhető meg ezeknél a fajoknál. A *C. albicans* mellett a másik, komoly problémát jelentő humánpatogén gomba, a *C. parapsilosis* ellen nem bizonyult antagonista tulajdonságúnak az általunk vizsgált *P. anomala* törzs, egy debreceni kórházból számazó klinikai *C. parapsilosis* izolátumokkal szemben nincs növekedés gátlás, törzsgyűjteményes törzsekkel (*C. parapsilosis* CLIB214 és SR23) szemben is csak minimális mértékű. Ezzel szemben a *C. parapsilosis* teleomorf alakjának tartott *L. elongisporus* mind a 8, tanszékünkön meglévő izolátumával szemben jó anatagonista hatásúnak bizonyult. Bor- és sörromlást okozó *Brettanomyces* és *Dekkera* fajok ellen nem tapasztaltunk jelentős gátló hatást. Az érzékenységet YM4 vagy YPD4 táptalajon vizsgáltuk, agar diffúziós módszerrel. A további kísérleteket a legjobb gátlási eredményeket adó fajok, a *C. norvegica* és *C. guillermondii* ellenében végeztük el.

4. 5. 2. A termeltetés optimális körülményeinek meghatározása

A szakirodalomból ismeretes, hogy a toxinok igen kis mennyiségben, általában 0,001-2 μg/ml koncentrációban szekretálódnak a fermentlébe (Sawant, 1989; Buzzini, 2004), ezért elsőként meghatároztuk a termelődéshez szükséges optimális feltételeket.

A termeléshez a 4-es pH és 20°C bizonyult a legmegfelelőbbnek. A tápoldat összetétele befolyásolja a toxintermelést, a komplett tápoldatban (2xYD4, 2xYPD4, YM4) való tenyésztés során kaptuk a legnagyobb aktivitású fermentlevet, minimál tápoldatban történő (VMM, YNB) tenyésztéskor jóval kisebb aktivitást tapasztaltunk. Hasonló jelenséget más toxin, például a *Pichia anomala* K5 típusú toxinja esetében is tapasztaltak korábban (Izgü, 2004). A jelenséget az élesztőkivonatban megtalálható β-D-glükánok hiányával magyarázták, melyek indukálhatják a toxin termelődését. Három napos komplett tápoldatban tenyésztést követően a sejteket minimál tápoldatva átoltva a fermentlé aktívnak bizonyult különböző *Candida* fajok ellen, ebben az esetben a sejtekben akkumulálódott és még nem szekretált toxinokat bocsájtják ki a sejtek. A

2. táblázat. *Pichia anomala* toxinok gátló aktivitása különböző élesztőgombák ellen

Vizsgált törzsek	GN toxin gátlás mértéke (mm)	N toxin gátlás mértéke (mm)
Brettanomyces custersianus CBS 4805	-	-
Cryptococcus neoformans CBS 132	-	-
Candida alai NRRL Y-27739	5,0	2,5
Candida albicans ATCC 10231	1,5	-
Candida albicans CBS 14051	2,5	-
Candida albicans ATCC 38247	4	-
Candida albicans CBS 562	2,75	-
Candida albicans SC 5314	0,5	-
Candida albicans klinikai izolátum 3666 (I)	2,0	-
Candida albicans klinikai izolátum 10930 (I)	2,0	-
Candida albicans klinikai izolátum 9054 (II)	2,0	-
Candida albicans klinikai izolátum 17905 (II)	2,0	-
Candida albicans klinikai izolátum 4780 (III)	2,0	-
Candida albicans klinikai izolátum 5796 (III)	2,0	-
Candida albicans klinikai izolátum 17471 (IV)	2,0	-
C. albicans CBS 2695 (Pur)	1,5	-
C. albicans CBS 2706 (Arg)	4,0	-
C. albicans CBS 2712 (Chn)	2,5	-
C. albicans CBS 5736 (Rsa)	1,5	-
C. albicans CBS 6589 (UK)	1,5	-
C. albicans CBS 6910 (Nzl)	1,5	-
C. albicans CBS 8838 (USA)	0,5	-
C. albicans CBS 9120 (Jpn)	2,0	-
C. albicans NEQUAS 4661	2,5	-
Candida dubliniensis CBS 7987	5,0	-
Candida frijolensis NRRL Y-48060	2,5	-
Candida glabrata CBS 138	2,5	-
Candida guilliermondii CBS 566	3,0	-
Candida inconspicua CBS 990	2,0	-
Candida jiufengensis CBS 10486	2,0	-
Candida pseudojiufengensis CBS 10847	0,5	-
Candida krusei CBS 573	-	-
Candida lipolytica CBS 6124	4,0	-
Candida lusitaniae CBS 6936	-	-
Candida maltosa CBS 5611	5,0	-
Candida metapsilosis MCO 488	-	-
Candida neerlandica NRRL Y-27057	-	-
Candida norvegica CBS 4239	5,0	1,5
Candida oxicetoniae CBS 10844	-	-
Candida orthopsilosis MCO 456	-	-
Candida parapsilosis klinikai izolátumok	-	-
Candida parapsilosis CBS 2152	-	-
Candida parapsilosis CLIB 214	-	-
Candida parapsilosis SR 23	-	-
Candida pulcherrima CBS 5833	-	-
Candida rugosa CBS 613	-	-
Candida sojae CBS 7871	-	-
Candida subhasii CBS 10753	5,5	-
Candida tropicalis 24043	3,0	1,0
Candida tropicalis CBS 94	5,0	-
Candida viswanathii CBS 4024	3,0	-
Candida zeylanoides CBS 4909	-	-
Dekkera bruxellensis CBS 73	-	-
Kluyveromyces lactis	-	-
Lodderomyces elongisporus CBS 2605	2,0	-
Zygosaccharomyces sp.	-	-

legnagyobb mennyiséget YM4 tápoldatban történő tenyésztéssel nyertünk, 72 óra inkubálás után. 2xYPD4 tápoldatban tenyésztve valamivel kisebb aktivitású fermentlevet sikerült termeltetni. A sejteket komplettből vitaminos minimálba átoltva is jelentős aktivitás észlelhető, míg a két minimál tápoldat közül a YNB-s fermentlé nagyobb aktivitást mutat, mint a VMM fermentlé. A toxin tisztítása minimál tápoldatból egyszerűbb lenne, mint a sok, nagy mennyiségű fehérjemolekulát is tartalmazó komplett tápoldatokból.

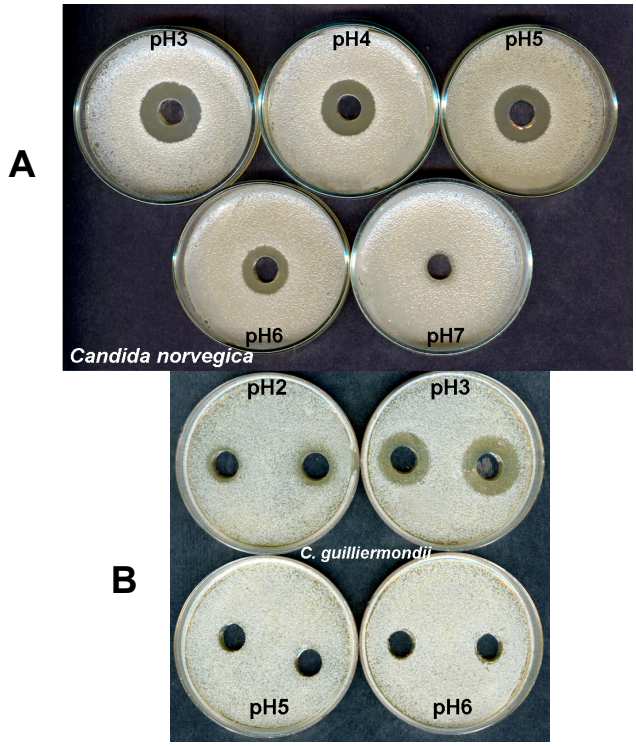
Biológiai aktivitását a fermentlé csak a növekvő sejtek korai stacioner fázisában nyerte el. Ez a jelenség összevetve azzal, hogy a toxin legerőteljesebben a fiatal, logaritmikus fázisban lévő érzékeny sejteket pusztítja, arra utalhat, hogy a természetben a killer-fenotípus szerepe a már elfoglalt élőhelyek védelme az újonnan érkező, invazív törzsek ellen. Mindemellett a késői stacioner fázisban már nem tudtunk aktivitást kimutatni. Ennek oka lehet egyrészt a tápoldat pH-jának eltolódása semleges ill. lúgos irányba, másrészt az öregedő sejtek erősödő proteáztermelése. Mindkét folyamat a toxin inaktiválódásához ill. degradálódásához vezet.

4. 5. 3. Toxin biokémiai természetének meghatározása

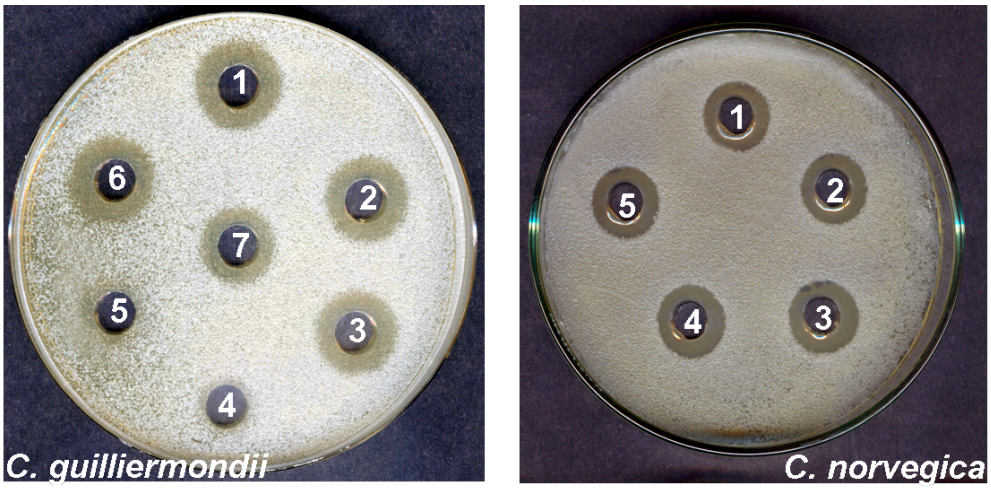
4. 5. 3. 1. Toxin aktivitásának pH- és hőmérsékletoptimuma

Mivel a legtöbb ismert toxin csupán viszonylag szűk, savas pH-tartományban aktív (Woods, 1968; Young, 1978), megvizsgáltuk, hogy a *P. anomala* törzs toxinjának pH-optimuma mennyiben felel meg ennek a megfigyelésnek. *C. norvegica* ellen a toxin aktivitása pH függetlennek bizonyult a savas tartományban (pH 2-pH 6), míg *C. guilliermondii* ellenében csak pH 3-4 tartományban tapasztaltunk aktivitást (12. ábra). Ez a kettősség arra utalt számunkra, hogy nemcsak egy, de kétféle toxint is termel a VKM Y-159 törzs, egy csak és kizárólag *C. norvegia* elleneset (később N toxin), illetve egy, többféle *Candida* faj (többek között *C. guilliermondii*) ellen hatásosat (később GN toxin). A továbbiakban ezt a két fajt használtuk fel a toxinok jellemzése során.

Az általunk vizsgált toxinok hasonlóan a többi killer toxinhoz savas pH-n aktívak. Neutrális ill. lúgos környezetben valószínűsíthetően a toxin konformációváltozása miatt irreverzibilisen inaktiválódik, mivel ha a toxint tartalmazó fermentlé pH-ját citrát-foszfát pufferrel 7-es vagy annál lúgosabb pH-ra állítjuk, majd vissza 4-esre, a toxin nem nyeri vissza aktivitását. Más toxinok esetén feltételezték, hogy az alacsony pH az érzékeny sejtek falához való kötődéskor játszik szerepet (Golubev, 2006).



12. ábra: *C. norvegica* (A) és *C. guilliermondii* (B) növekedésének gátlása különböző pH-jú táptalajokon



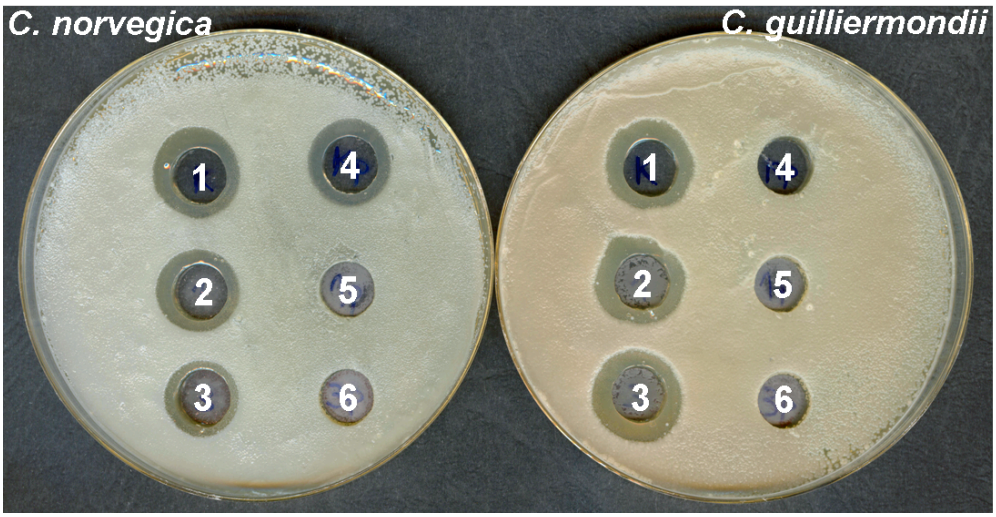
13. ábra: Hőstabilitási és fehérjebontó enzimekkel szembeni stabilitás vizsgálat
***C. guilliermondii* - 1.: kontroll YM fermentlé; 2.: proteináz K kezelt VMM fermentlé; 3.: pronáz E kezelt VMM fermentlé; 4.: régi VMM fermentlé; 5.: 100°C-os inkubáció; 6.: 42°C-os kezelés; 7.: kontroll VMM fermentlé**
***C. norvegica* - 1: kontroll YM fermentlé, 2: 37°C-on kezelt fermentlé, 3: 50°C-on kezelt fermentlé, 4: 100°C inkubáció, 5: proteináz K kezelés**

A toxin hőstabilitásának vizsgálatához *P. anomala* fermentlevet különböző hőmérsékleten (37°C, 50°C, 100°C) inkubáltuk, majd aktivitását lyuktesztben vizsgáltuk (13. ábra). A toxin

stabilnak bizonyult különböző hőmérsékleten történő inkubálásokat követően, sőt, *C. norvegica* elleni aktivitását több hónapig megtartotta 4°C-on.

4. 5. 3. 2. Enzimes kezelés hatása a toxin aktivitására

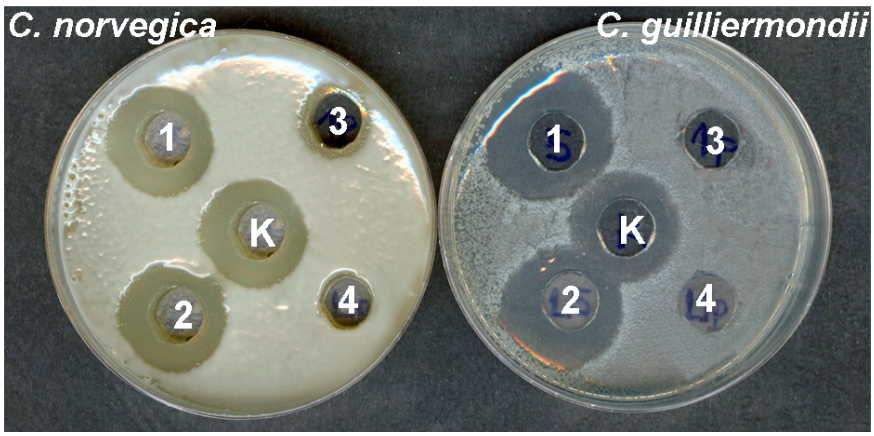
A toxinok fehérjetermészetének tisztázása érdekében különböző proteinbontó enzimekkel (proteináz K, pronáz E) inkubálva vizsgáltuk, hogy csökken-e az aktivitás? A toxin viszonylag ellenállónak bizonyult proteináz K és pronáz E hatására is (13. ábra). Ezen eredmények után felmerült annak lehetősége, hogy a toxin nem fehérje, hanem a szakirodalomban már néhány esetben leírtakhoz hasonlóan lipid természetű. Ezért a mintákat lipáz (Sigma) kezelésnek vetettük alá (14. ábra). A lipáz kezelést különböző időtartamokig végeztük 37ºC-on, pufferelés nélkül, a pH 4-es fermentlével, illetve a gyártó utasítása szerint pH 7,5-es értéken, a fermentlevünket a kezelés idejére az adott értékre lúgosítva, majd a kezelés letelte után visszasavanyítva pH 4-re.



14. ábra: A killer aktivitás változása lipáz kezelés után
1: kontroll N és GN toxin; 2: 1h 37ºC-os lipáz (7,5 mg/ml) kezelés; 3: 3h 37ºC-os lipáz (7,5 mg/ml) kezelés; 4: kontroll pufferelve 1h-ig 37ºC-on; 5: 1h 37ºC-os lipáz (7,5 mg/ml) kezelés pufferelve; 6: 3h 37ºC-os lipáz (7,5 mg/ml) kezelés pufferelve

A *C. norvegica* ellenes toxin (N toxin) pufferelés nélkül 1 óra, majd 3 óra múlva csökkenő aktivitást mutatott, pufferelve a pufferelétlen kontrollhoz mérhető aktivitás már 1 órát követően megszűnt (14. ábra). A *C. norvegica* és *C. guilliermondii* ellenes GN toxin pufferelés nélkül még 3 óra múlva is azonos aktivitást mutatott a kontrollal, míg a pufferelés önmagában is aktivitásvesztéshez vezetett. Az időtartamot 5 órára megemelve nem tapasztaltunk aktivitás csökkenést egyik toxin esetében sem, a 37ºC-os inkubálás utáni aktivitás összemérhető volt a

lipáz kezelt minta aktivitásával. A GN toxin pufferelés után elveszti aktivitását, az N toxin aktivitása pufferelve ugyan csökken lipáz kezelés nélkül is, de ugyanolyan idejű lipáz kezelés hatására elveszik (15. ábra).



15. ábra: A killer aktivitás változása lipáz kezelés után
K: kontroll N és GN toxin; 1: 37ºC-os inkubálás 5 h-ig; 2: 37ºC-os inkubálás 5 h-ig 15 mg/ml lipázzal; 3: 37ºC-os inkubálás 5 h-ig pufferelve; 4: 37ºC-os inkubálás 1 h-ig 15 mg/ml lipázzal, pufferelve

A toxin kémiai természetére irányuló kísérletünk eredményeként elmondhatjuk, hogy a *P. anomala* GN toxinja valószínűsíthetően fehérje természetű. A magasabb hőmérsékletnek és fehérjebontó enzimeknek ellenálló tulajdonsága egy kis méretű peptidet jósol. Az N toxin esetén felmerül a lipid természet lehetősége.

4. 5. 4. A toxin hatásmechanizmusának vizsgálata

A toxin hatásmódját élőcsíraszám meghatározásos módszerrel vizsgáltuk. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált toxin cidikus, a toxinnal kezelt sejteknek 34%-a pusztult el 2 órás inkubáció elteltével, 24 órás inkubáció után az elpusztult sejtek aránya 87%-ra nőtt. $5x10^6$ sejt 12 órás, toxinnal együtt történő inkubációját követően 500 sejtből átlagban 0,66 (*C. norvegica*) illetve 2,66 (*C. guilliermondii*) volt a telepképző egységek (CFU) száma. Hőkezelt (30 perc 100ºC-on) killer toxin esetén a CFU száma 500 sejtből *C. guilliermondii* esetén átlagban 122,3, míg *C. norvegica* esetén egy alatti ez az érték.

Pontosabb eredmények érdekében áramlási citometriás méréseket is végeztünk, propídium jodiddal (PI) történő festést követően a sejtek életképességének vizsgálatára (3. táblázat). Az élő sejtek PI negatívok, a halott sejtek pedig PI pozitívok.

3. táblázat: Toxinnal inkubált *C. guilliermondii* és *C. norvegia* sejtek életképesség vizsgálata áramlási citometriás módszerrel

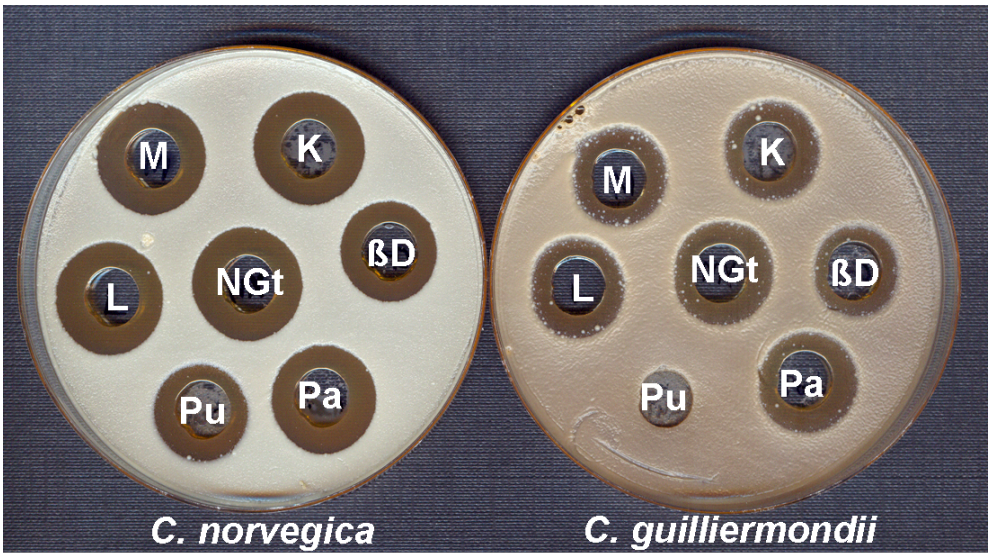
12 órás minták	PI- (%)	PI+ (%)
***C. guilliermondii* kontroll**	86,24	13,76
***C. guilliermondii* + 100ºC kezelt N toxin (pH 7)**	83,76	16,24
***C. guilliermondii* + N toxin (pH 7)**	76,08	23,92
***C. guilliermondii* + 100ºC kezelt GN toxin**	62,9	37,1
***C. guilliermondii* + GN toxin**	27,56	72,44
***C. norvegica* kontroll**	95,46	4,54
***C. norvegica* + 100ºC kezelt N toxin (pH7)**	12,46	87,54
***C. norvegica* + N toxin (pH7)**	12,15	87,85
***C. norvegica* + 100ºC kezeltGN toxin**	14,58	85,42
***C. norvegica* + GN toxin**	4,98	95,02

A vizsgálatokat követően elmondhatjuk, hogy a 100ºC-os kezelés, valamint a pH eltolása 7-es értékre is inaktiválja a GN toxint, az N toxin azonban aktív marad ezen körülmények mellett, így az N toxint külön tudjuk vizsgálni *C. norvegica* ellen. A GN toxin 12 órát követően a *C. guilliermondii* sejtek majdnem 73%-át ölte el. Az N toxin a *C. norvegica* sejtek 85-87%-át, míg a GN toxin azok 95%-át pusztítja el.

Sejtciklus vizsgálat során DAPI-val vizsgáltuk a G1 illetve az S fázisban lévő sejtek arányát. Elmondhatjuk, hogy egyik toxin sem a sejtciklust gátolja, hiszen az áramlási citometriás mérések során a kontroll és toxinkezelt sejtek esetén is két csúcsot kaptunk, ami megfelel a G1 és S fázisban lévő sejteknek.

4. 5. 5. Sejtfalkomponens affinitás vizsgálat

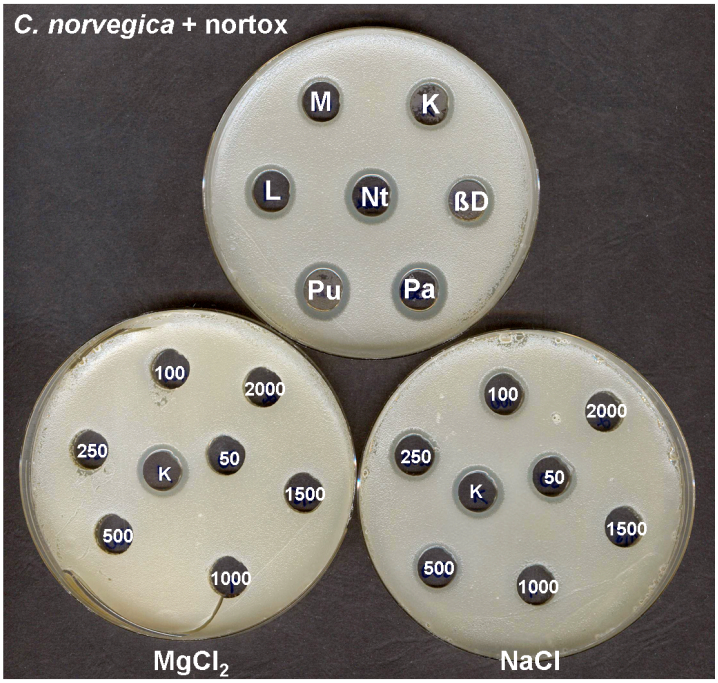
A szakirodalomban eddig ismert *Pichia* fajok killer toxinjainak receptora, ellentétben a *S. cerevisiae* K1 toxinjával nem a β-1,6 D-glükán (pusztulán), hanem a β-1,3 D-glükán, ami a fő poliszacharid a sejtfalban. Vizsgálatunk során a toxin affinitását vizsgáltuk különböző sejtfalkomponensekhez. A toxin és a sejtfalkomponensek együtt történő inkubációját követően érzékeny sejteken vizsgáltuk a gátló hatást (16. ábra).



16. ábra: NGT toxin affinitása különböző sejtfalkomponensekhez
NGT: kontroll GN toxin, L: laminarin, K: kitin, Pu: pusztulán (β-1,6 D-glükán), M: mannán; Pa és BD: β-1,3 D-glükán

A kísérletek során a GN toxin (mely *C. guilliermondii* és *C. norvegica* ellen is aktív) aktivitása mannán, laminarin és kitin jelenlétében nem csökkent, a toxin pusztulánnal való inkubációja során tapasztaltunk csupán gátlási zóna csökkenést *C. guilliermondii* ellen, míg *C. norvegica* ellen egyik esetben sem történt aktivitás csökkenés, azaz elmondhatjuk, hogy ellentétben a legtöbb *Pichia* faj toxinjával, ebben az esetben nem a β-1,3 D-glükán, hanem a β-1,6 D-glükán a toxin receptora a sejtfalban. A csak *C. norvegica* ellenes toxint egy- illetve kétértékű ionok ellen vizsgálva megállapíthatjuk, hogy ennek a toxinnak az érzékeny sejtekhez történő kapcsolódása ionos kölcsönhatáson alapszik, hiszen már 50 mM $MgCl_2$, illetve 500 mM feletti NaCl koncentráció gátló hatással van az aktivitásra, azaz elsősorban a kétértékű ionokkal való kölcsönhatás játszik szerepet a toxin megkötésekor (17. ábra). A GN toxin esetén az egy- illetve a kétértékű ionoknak sincs gátló aktivitása, még 2 M koncentrációban sem.

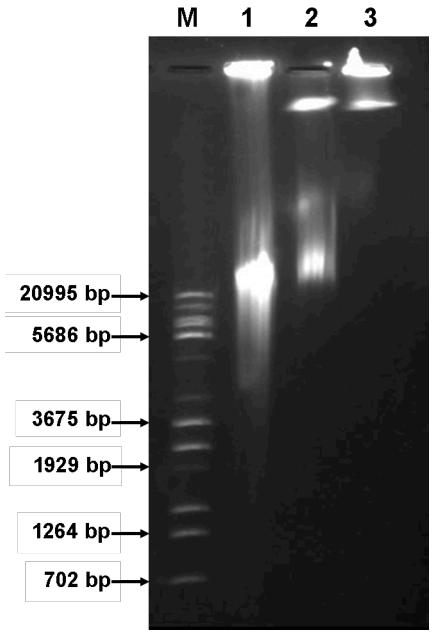
Vizsgáltuk a toxinok hatását az érzékeny törzsek protoplasztjai ellen is. A GN toxinnak a *C. guilliermondii* protoplasztok ellen nincs aktivitása, amely a sejtfali receptor meglétét támasztja alá. Az N toxinnak a *C. norvegica* protoplasztok ellen megvan a gátló hatása, ami megerősíti az N toxin ionos kölcsönhatáson alapuló kötődését.



17. ábra: Az N toxin affinitása különböző sejtfalkomponensekhez, illetve különböző koncentrációjú sók mellett
Nt: kontroll N toxin, L: laminarin, K: kitin, Pu: pusztulán (β-1,6 D-glükán), M: mannán; Pa és BD: β-1,3 D-glükán
K: kontroll N toxin; 50-100-250-500-1000-1500-2000 mM $MgCl_2$-dal és NaCl-dal inkubált toxin

4. 5. 6. A killer aktivitás genetikai hátterének vizsgálata

Az élesztőgombák killer toxinjai általában dsRNS vírusokon vagy DNS plazmidokon kódoltak, de néhány esetben előfordul, hogy kromoszómális gének determinálják a fenotípust. Munkám során kerestük extrakromoszómális elemek jelenlétét a *P. anomala* sejtekben. A plazmid és vírus izolálási kísérletek eredménytelensége után PFGE technikával vizsgáltuk az esetleges plazmidok jelenlétét, de sem DNS plazmidot sem dsRNS vírusokat nem tudtunk kimutatni a sejtekből (18. ábra). Hasonlóan az eddig vizsgált killer fenotípusú *P. anomala* törzsekhez, esetünkben is kromoszómális gén felelős a toxin termelésért.

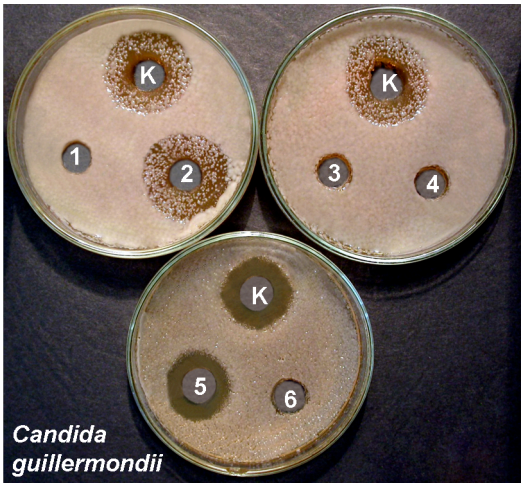


18. ábra: A pulzáltatott mezejű gélelektroforézis
M: λ DNS *Eco*47III/*Eco*91I, 1: mtDNS frakció, 2: protoplasztok, 3: intakt sejtek

4. 5. 7. Fehérje analízis

Az előzetes vizsgálatok arra utaltak, hogy az általunk vizsgált *P. anomala* törzs nem egy típusú toxint termel. A fermentleveket különböző áteresztőképességű szűrőkön átszűrve azt tapasztaltuk, hogy a *C. norvegica* ellen aktív toxin, még a 10 kDa szűrön is átjut. Ez a toxin ugyanakkor már hatástalan a többi *Candida* fajjal szemben.

A különböző pórusú fehérjeszűrőkön megszűrt, minimál tápoldatban utótenyésztett *Pichia* fermentlevének aktivititását vizsgáltuk *C. guilliermondii* ellenében (19. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a 10 kDa alatti frakciónak nincs aktivitása, míg a szűrőn fennmaradó frakciónak a szűretlen, kontroll fermentlével azonos mértékű gátló hatása van. Az 50, illetve a 100 kDa alatti frakcióknál nem tudtunk kimutatni aktivitást, de a 100 kDa szűrőn fennmaradt fermentlénél a kontrollal majdnem azonos méretű gátlási zónát detektáltunk, így a *C. guillermondii* ellenes toxin méretét 100 kDa felettinek jósoltuk meg.



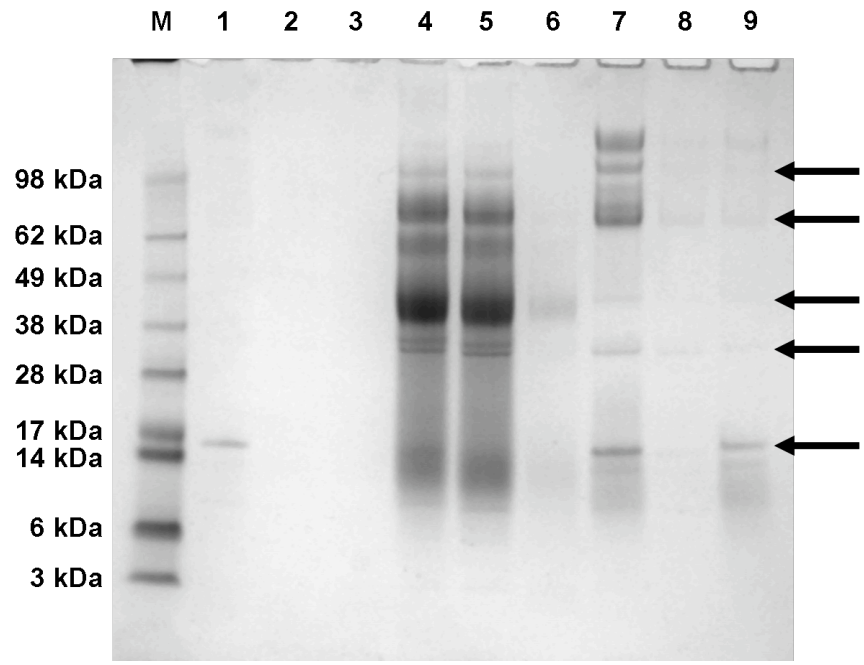
19. ábra: Szűrt *P. anomala* fermentlevek aktivitás vizsgálata *C. guilliermondii* ellenében K: *Pichia* fermentlé (pH 4); 1: 10 kDa szűrőn átfolyó; 2: 10 kDa szűrőn fennmaradó; 3: 50 kDa szűrőn átfolyó; 4: 50 kDa szűrőn fennmaradó; 5: 100 kDa szűrőn fennmaradó; 6: 100 kDa szűrőn átfolyó frakció

Komplett (YM) és minimál (VMM) tápoldatban tenyésztett *Pichia* sejtek különböző korú fermentleveit 100 kDa és 50 kDa szűrőn is áteresztve vizsgáltuk az aktivitásokat (20. ábra). Szűrés után a 100 kDa feletti frakciónál is megfigyeltünk gátló hatást. A kontroll fermentlével egybehangzó eredményeket kaptunk egy 1 héttel fiatalabb mintánál is. A minimálos fermentlénél a szűretlennel majdnem megegyező aktivitást kaptunk a 100 kDa feletti frakciónál, míg az átfolyó frakciónak nem volt aktivitása. Ezzel szemben a komplett fermentlénél a 100 kDa alatti frakciónak is volt aktivitása. Ennek magyarázata lehet, hogy a *P. anomala* sejteknek van egy 100 kDa feletti, illetve egy 100 kDa alatti toxinja is, ami hatásos *C. guilliermondii* ellen: komplett tápoldatban történő tenyésztés során az összes 100 kDa alatti toxin molekulát kibocsájtják magukból a 100 kDa felettiek mellett, így a komplett fermentlé 100 kDa feletti és alatti frakciójának is van aktivitása. Komplett tápoldatból minimálba átoltva a sejteket, azok már csak a bennük akkumlálódott, 100 kDa feletti toxin molekulákat szekretálják ki, így itt csak a fennmaradó frakciónak van gátló hatása. Egy másik magyarázat lehet, hogy a *C. guilliermondii* ellenes toxin inkább lineáris konformációjú, mint globuláris, így a szűrő pórusain valamennyi átjut az alsó frakcióba, annak ellenére, hogy a szűrő 100 kDa áteresztőképességű. Az 50 kDa alatti frakció aktivitását se a komplett, se a minimál fermentlé esetén nem tudtuk kimutatni.

20. ábra: 080616-i (1-4) és 080623-i (5-8), minimál (VMM) és komplett (YM) fermentlevek szűrését követő aktivitás vizsgálat.
1, 5: szűretlen fermentlé; 2, 6: 100 kDa feletti frakció; 3, 7: 100 kDa alatti frakció; 4, 8: 50 kDa alatti frakció

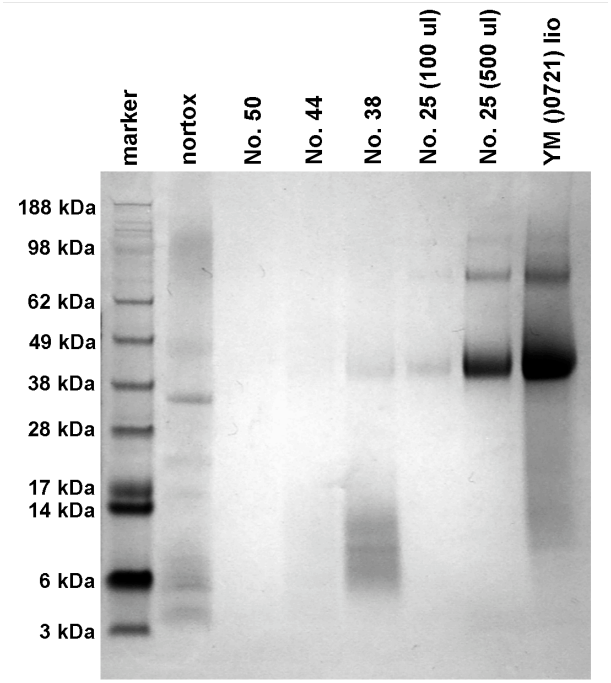
A toxinok pontosabb méretének meghatározása céljából a fermentleveket SDS PAGE módszerrel vizsgáltuk a továbbiakban. Eredeti töménységű és liofilizálással betöményített fermentleveket megfuttattva sokkal jobban detektálható fehérje sávokat kaptunk a betöményített minták esetén. A minimál fermentlé a fehérjék futtatása céljából alkalmasabbnak tűnik, hiszen a komplett fermentlével szemben kevesebb, a vizuális detektálást nehezítő anyagot (többféle, nagytömegű fehérjemolekula) tartalmaz.

Különböző idős, TCA kicsapott fermentleveket megfuttatva több sávot detektáltunk (21. ábra), ezek között vannak olyan fehérjesávok, melyek több, különböző idejű fermentlé esetén is kimutathatóak: egy 14-17 kDa közötti, egy 28-38 kDa közötti, egy 38-49 kDa közötti, egy 62 kDa feletti, illetve egy 98 kDa-os marker sávval közel egyvonalban futó fehérje sáv. A megelőző eredményeink alapján a 98 kDa méretű fehérje egy lehetséges jelöltnek tűnt a *P. anomala* által termelt toxinok közül a *C. guilliermondii*-*C. norvegica* ellenes GN toxin szerepére. A közel 100 kDa-os méret magyarázatot adhat arra a korábbi kísérletünkre is, mely során a *C. guilliermondii* ellenes *P. anomala* fermentlevet 100 kDa áteresztőképességű szűrőn átengedve, mind a 100 kDa feletti, mind az azalatti frakciónak volt aktivitása, abban az esetben, ha a 100 kDa szűrőnek van egy kismértékű hibalehetősége, mely során nemcsak a 100 kDa-nál nagyobb fehérjéket fogja meg.



21. ábra: Különböző fermentlevek TCA kicsapás utáni SDS PAGE képe. M: SeeBlue Plus2 molekulasúly marker, 1: szűretlen VMM fermentlé; 2: szűrt VMM fermentlé, 100 kDa feletti frakció; 3: szűrt VMM fermentlé, 100 kDa alatti frakció; 4: szűretlen YM fermentlé (080410); 5: szűrt YM fermentlé, 100 kDa feletti frakció; 6: szűrt YM fermentlé, 100 kDa alatti frakció; 7: szűretlen YM fermentlé (080623); 8: szűrt YM fermentlé, 100 kDa feletti frakció; 9: szűrt YM fermentlé, 100 kDa alatti frakció. Nyilak: lehetséges toxin fehérje molekulák.

A továbbiakban a fermentlevet oszlopkromatográfiás módszerekkel próbáltuk tisztítani. A Sephadex oszlop megfelel egy alap batch kromatográfiának egy fehérje tisztítása során egy crude mintából (pl: fermentlé). A módszer alkalmas a nem kívánatos anyagok elszeparálásán kívül koncentrálásra is, így a tisztítás iniciációs lépésének tökéletesen megfelel. A tisztítást követő SDS PAGE kép (22. ábra) alapján ki tudtuk zárni a nagyobb méretű toxinok lehetőségét, hiszen az ezeket a méretű fehérjéket tartalmazó frakcióknak nem volt aktivitása. Az aktivitással rendelkező frakciók ugyan tartalmazták a 38-49 kDa mérettartományba eső fehérjét, de ez megtalálható a nem aktív frakciókban is, így ezt is ki tudtuk zárni a további vizsgálatokból. Az aktív frakciók 6 és 14 kDa között több sávot tartalmaznak, ezek egyike egy lehetséges jelölt lehet, mint a keresett GN toxin.

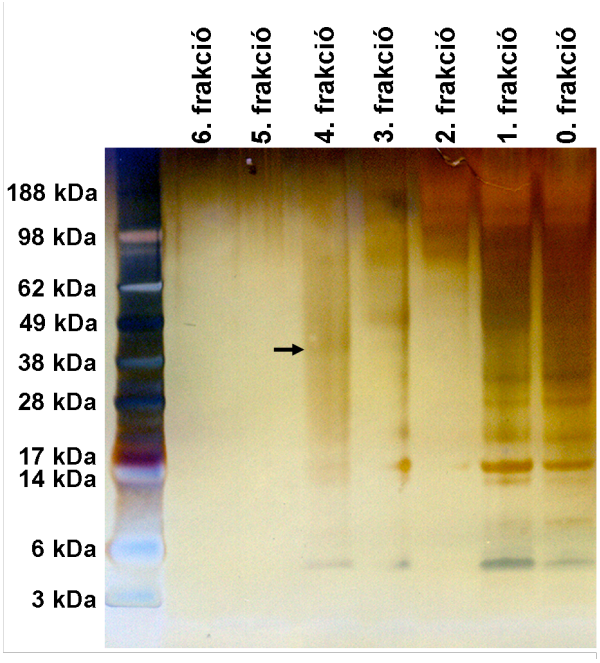


22. ábra: Komplett fermentlé Sephadex oszlopon történő tisztítását követően a különböző frakciók SDS PAGE képe
nortox: *C. norvegica* ellenes toxin TCA kicsapást követően, YM: kontroll, szűretlen komplett fermentlé, No. 50, No. 25: frakciók aktivitás nélkül; No. 38, No. 44: frakciók aktivitással

A továbbiakban az aktív frakciók tisztítását anion (DEAE Sepharose), majd kationcserélő (CM Sepharose) oszlopon végeztük. A kezdő pH-nak legalább 1 egységgel a pI felett kell lennie egy anioncserélő esetén, míg kationcsere esetén 1 egységgel alatta, hogy a megfelelő kötődés megtörténjen. A Sephadex oszlopon megtisztított fermentlevet először anioncserélő oszlopon folyattuk át pH 4,6-os vivő és eluáló puffereket (McIlvain citrát-foszfát puffer) használva, arra számítva, hogy a toxinunk izolelektromos pontjával nem esik egybe a pufferek pH-ja, illetve a toxint még olyan pH értéken tartva, hogy annak aktivitása nem veszik el. Mintafelvitelt követően növekvő sókoncentrációkkal eluáltunk (0 M-0,05 M-0,5 M-1 M), a szedett frakciókat pedig agar-diffúziós módszer alapján teszteltük, a frakciók dialízisét követően. Az általunk keresett toxin a mintafelvitel során átfolyt az oszlopon, aminek oka a toxin izoelektromos pontjához túl közeli pH megválasztása volt, de feltételezhetően a folyamat során egyéb, szennyező anyagoktól tovább tisztulhatott a fermentlevünk.

Az anioncserélő oszlopon átfolyatott fermentlevet a továbbiakban CM Sepharose kationcserélő oszlopon tisztítottuk jóval a vélt izoelektromos pont alatti pH-jú pufferekkel, 2,5-ös értéken. Ezen a pH-n történő kromatográfiás tisztítás során szedett frakciók egyikének sem volt aktivitása. A szedett frakciók pH-ját visszaállítva pH 4,6-ra, sem volt aktivitás észlelhető, azaz a

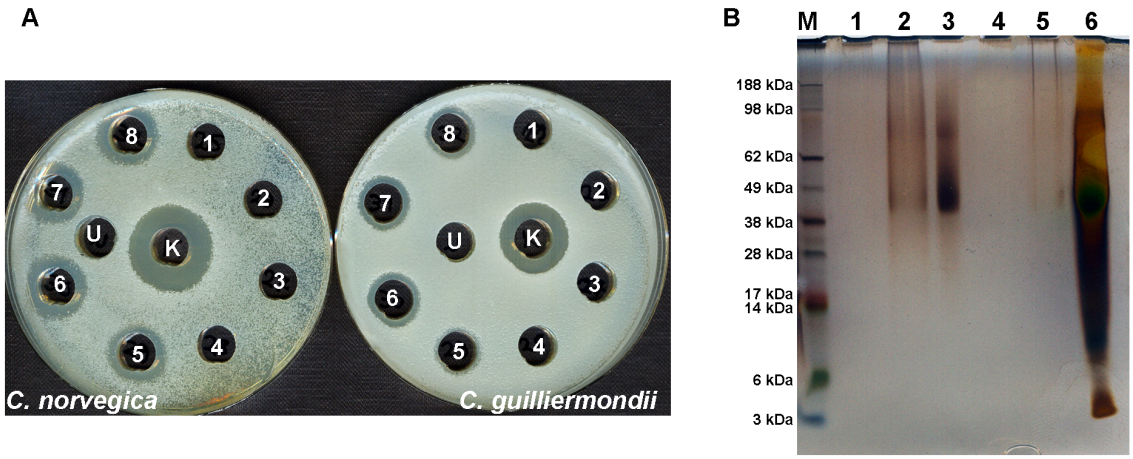
pH 2,5 érték irreverzibilisen inaktiválta a keresett toxint. A kationcserét pH 3,5-en megismételve nem jutottunk közelebb az GN toxin pontosabb méretének meghatározásához. Agardiffúziós tesztet követően a 4-es és 5-ös frakciók bizonyultak aktívnak. SDS PAGE után nem kaptunk olyan diszkrét sávot, amely a nem aktív frakciókból hiányzik (23. ábra). A 38-49 kDa tartományban egy kevésbé jól körülhatárolható (az ábrán nyíllal jelölt) sávot lehet detektálni, azonban egy, az ebbe a tartományba eső fehérjét korábban már kizártunk. Mindezek ellenére nem lehet kizárni, hogy ebben a mérettartományban csak egy fehérjét látunk az SDS PAGE képen. Elmondhatjuk, hogy az GN toxin méretéről pontosabb adatot nem tudtunk meg, ehhez további vizsgálatok szükségesek.



23. ábra: VMM fermentlé pH 3,5-en történő kationcseréje utáni frakciók: 0: mintafelvitel; 1: 0 M NaCl-os pufferel mosás; 2: 0,05 M NaCl-os pufferrel mosás; 3: 0,5 M NaCl-os pufferrel mosás; 4: 1 M NaCl-os pufferrel mosás; 5-6: 0 M NaCl-os pufferrel regenerálás

Az előzőekben leírt kísérletek nem egyértelmű, kis hatékonyságú eredményeit követően specifikusabb módszerrel próbálkoztunk a toxin tisztítására. Mivel a GN toxin sejtfali receptora valószínűleg a pusztulán (β-1,6-glükán), így ezt a kötődést kihasználva, affinitáskromatográfiás módszerrel próbáltuk meg a toxin tisztítását. Epoxi-aktivált Sepharose 6B mátrixhoz pusztulánt kötöttünk ligandként, majd NaCl-os, ureás és TritonX-100-as mosással próbáltuk a toxint eluálni. Egyre növekvő pH-jú 1,5 M NaCl-dal kiegészített pufferrel sem sikerült eluálni, viszont 2 M urával kiegészített pufferrel kapott frakcióknál gátlást figyeltünk meg. Töményítés után SDS-

gélelektroforézissel azonban nem sikerült olyan sávot elválasztani, amit a korábbiakban nem zárunk ki: 38-49 kDa közötti és 62-98 kDa közötti sávok (24. ábra).



23. ábra: *P. anomala* GN toxin affinitáskromatográfia aktív frakciónak vizsgálata csészés (A) és SDS PAGE (B) módszerrel.
A: K: YM fermentlé; 1: citrát-foszfát puffer pH5 + 1,5M NaCl eluens első frakció; 2: második frakció; 3: harmadik frakció; 4: negyedik frakció; 5: 2M urea pH4 + 1,5M NaCl eluens első frakció; 6: második frakció; 7: harmadik frakció; 8: negyedik frakció; U: 2M urea kontroll
B: M: SeeBluePlus2; 1: urea 3.frakció; 2: urea 2.frakció; 3: urea 1.frakció; 4: pH 4,8 mosó; 5: pH 4,2 mosó; 6: átfolyó

Mivel az előző módszerekkel nem sikerült pontos adatot nyerni a GN toxin méretéről, ezért UV mutagenezissel nem termelő mutáns *P. anomala* törzseket állítottunk elő, majd azok fermentleveinek SDS PAGE képét hasonlítottuk össze a vad típusú *P. anomala* törzsével, azonban nem sikerült kimutatni olyan fehérjesávot, ami a vad típushoz képest a mutánsokban eltűnt volna.

5. Összefoglalás

Az elmúlt évtizedekben a *Candida* fertőzések, ezen belül a *C. albicans* infekciók száma egyre növekvő számot mutat, aminek oka az egyre szélesebb körű antibiotikum használat és az immunszuppresszált betegek emelkedő száma. E miatt egyre sürgetőbb különböző megelőzési stratégiák kidolgozása, amihez fontos újabb és újabb molekuláris tipizálási módszerek megalkotása. A már meglévő módszerek többsége kromoszómális markereken (mikroszatellit hossz polimorfizmus (microsatellite length polymorphism=MLP), Ca3 fingerprinting, RAPD (random amplification of polymorphic DNA), multilocus sequence typing (MLST)) illetve enzim polimorfizmuson (multilocus enzim elektroforézis (MLEE)) alapul. A fent említett módszerek kiegészítéseként lehetőség van extrakromoszómális elemek, például mitokondriális DNS alapú technikák kidolgozására. Munkánk célja volt extrakromoszómális alapú metódus kidolgozása.

A 2004-2005-ben egy debreceni kórházban 103 *Candida* izolátumot gyűjtöttek, amiből 44 eset (42,7%) bizonyult *C. albicans*-nak. Megvizsgáltunk ezen izolátumok mtDNS polimorfizmusát. Totál DNS-t négy felismerőhelyű restrikciós enzimekkel emésztve vizsgáltuk a mtDNS RFLP mintázatát: *Hae*III - azonos mintázat, Hin6I - kettő típus, *Hinf*I - négy típus. A legtöbb izolátumot, szám szerint 23-at tartalmazó csoportot I. típusként jelöljük, a II. és III. típus megközelítőleg azonos számú izolátumot foglal magában, 11-et illetve 9-et, míg a IV. csoportot mindössze 1 izolátum képviseli.

A mtDNS RFLP típusok egy-egy képviselőjének izolált mtDNS-ét frekventáltan hasító enzimekkel (*Bgl*II és *Eco*RV) emésztettük, mindkét restrikciós enzimmel jól elkülönülő mintázatot kaptunk mind a négy típus esetén. A III. típus emésztési képe és a kapott fragmentumok mérete azonosnak bizonyult a génbankban található SC 5314 törzs *in silico* emésztésével, mely törzs mtDNS mérete 40420 bp. Ezt követően a mtDNS RFLP típusok képviselőinek izolált mtDNS-ét számos, nem túl sok, hasítóhellyel rendelkező enzimmel emésztettük. *Pvu*II-vel történő emésztés után az egyes típusok (I.: 10930; II.: 9132; III.: 5796; IV.: 17471) azonos mintázatot mutattak. Minden típusban 6 fragmentum figyelhető meg, melyek összmérete kb. 40 kb. A legkisebb dupla fragmentum (amely a repetitív régió része) méretében agaróz gélelektroforézis során ~50 bp eltérés figyelhető meg az I., II. és IV. típusok esetén a III. típushoz viszonyítva. A legkisebb *Pvu*II-es fragmentum köré primereket terveztünk, majd az adott régió nukleotid szekvenciáját meghatároztuk: az 5796 (III) és 9132 (II), és 17471 (IV) törzs esetén egy 55 bp deléciót detektáltunk a *cox*3 gént megelőző intergénikus régióban. Ez a *Pvu*II fragmentum tartalmazza a már korábban leírt EO3 régiót (Miyakawa 1992, 1994), mely egy *C.*

albicans fajspecifikus DNS régió, hossz- és *Bgl*II restrikciós hely-polimorfizmust mutat, aminek oka két 50 nt szegmens (A és B) megléte vagy hiánya. Miyakawa és munkatársai 2008-ben négy típus meglétét írták le: az L tartalmazza az A és B szegmenst is, az MI csak az A-t, az MII csak a B-t, míg az S típus egyiket sem. Az általunk vizsgált klinikai izolátumok négy típusát sikerült beazonosítani a Miyakawa és munkatársai által létrehozott csoportokba: az 5796 (III) az L, a 9132 (II) és 10930 (I) az MII, míg a 17471 (IV) MI csoportba tartozik. Az általunk vizsgált klinikai *C. albicans* populáció egyik tagja sem mutatott azonos képet az S típussal. Szekvencia adatok alapján a 9132 és 10930 törzs ezen régiója az A szegmenst, a 17471 törzs pedig a B szegmenst tartalmazza, épp fordítva, mint ahogy azt az RFLP képük alapján történő besorolásuk követelné.

Elkészítettük a négy mtDNS RFLP típus (I.: 10930; II.: 9132; III.: 5796; IV.: 17471) fizikai térképét *Eco*RI-*Eco*RV enzimeket felhasználva. Mivel a III. típusba tartozó 5796 törzs *Eco*RV és *Bgl*II emésztési képe megegyezik a génbankban található SC5314 törzs *in silico* emésztésével, ezért annak térképét vettük alapul a továbbiakban. Szekvencia adatok alapján elmondhatjuk, hogy a típusokban bekövetkezett *Eco*RV hasítóhely keletkezésekért és megszűnésekért pontmutációk (pl.: GAT/ATC helyett GGT/ATC, azaz A→G tranzíció) felelősek. Elkészítettük a típusok parciális funkcionális térképét is, és megállapítottuk, hogy a génsorrend nem változott a génbankban található SC 5314 törzshöz képest.

A térképeket alapul véve kiválasztottunk egy olyan régiót, amely *Eco*RV hasítási mintázata eltér a négy típusban: az FZRV régió az *Eco*RI 1. fragmentumon található, tartalmazza a *srRNS* gén végszekvenciáját, intergénikus szekvenciát és a teljes *nad4l* gént (28321 bp–29888 bp). Az SC5314-es törzs szekvenciája alapján a régió (FZRV) köré primer-párt terveztünk, és vizsgáltuk a 44 izolátum PCR-RFLP képét *Eco*RV enzimet használva. Az összes izolátum a totál DNS RFLP besorolásának megfelelő mintázatot mutatta (I. nincs hasítóhely-1551 bp; II. két hasítóhely-920 bp, 403 bp, 228 bp; III. egy hasítóhely-1323 bp, 228 bp; IV. egy hasítóhely-1323 bp, 228 bp). A IV. típusba csak egy izolátum (17471) tartozik, melynek PCR-RFLP képe *Eco*RV-öt használva nem, *Bgl*II-t alkalmazva azonban eltérő a III. típus mintázatától. Különböző földrajzi helyekről származó, törzsgyűjteményes *C. albicans* izolátumokat vizsgáltuk meg az FZRV régió PCR-RFLP képére nézve. Az összes izolátum besorolható volt az általunk létrehozott mtDNS RFLP típusok valamelyikébe. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az FZRV régió vizsgálata PCR-RFLP módszerrel jó tipizálási és csoportosítási metódusnak bizonyul mind hazai,

mind külföldi *C. albicans* izolátumok között, és egy alternatívát nyújthat a már leírt EO3 régió vizsgálata mellett.

Megvizsgáltuk a mtDNS mintázat alapján elkülönített négy típus elektroforetikus kariotípusát is, ami az I., III. és IV. típus esetén megegyezik a *C. albicans* 1006 törzsével, míg a II. típus egy plusz kromoszóma sávot tartalmaz, ami 3. és 4. kromoszóma között helyezkedik el (1.8 Mb és 1.7 Mb). A *C. albicans* WO-1 törzse szintén hordoz egy extra kromoszómát a 1006 törzshöz képest, de annak mérete (1,65 Mb) különbözik a II. típusnál megfigyelttől.

Kísérleteink során a *C. albicans* kládba tartozó másik fontos opportunista humán patogén faj, a *C. parapsilosis* különböző izolátumainak mtDNS polimorfizmusát is vizsgáltuk. A debreceni egyetemről származó 23 klinikai izolátum esetén azonos RFLP mintázatot kaptunk, mely megegyezik az irodalomban publikált adatokkal.

A *C. albicans* kládba tartozó fajok taxonómiai kapcsolatainak és a mitokondriális genom eredetének vizsgálatára irányuló nemzetközi projekt részeként a klád egyik apatogén, imperfekt, szénhidrogén-asszimiláló fajának, a *C. maltosa* mtDNS-ének vizsgálatát végeztük el. *Eco*RV-*Pst*I, illetve *Hind*III-*Pst*I restrikciós térképezést követően a pozsonyi Comenius Egyetem Biokémiai Tanszékével kooperációban a teljes mt genomot megszekvenáltattuk. A CBS 5611 törzs mitokondriális DNS-e 62949 bp méretűnek és cirkuláris konformációjúnak bizonyult. A genom a standard mt génkészletet hordozza: *atp*6-8-9, *cox*1, *cox*2, *cox*3, *cob, nad1-2-3-4-4L-5-6, rns, rnl*, illetve 26 db tRNS. A gének közül 3-ban található 2-2 intron: a *cox*1, *cob* és *rnl*. A mt genom két repeat régiót tartalmaz: direkt szálon a 12859-27237 bp, illetve a komplementer szálon a 40937-55315 bp szakasz, melyek kódoló régiót nem tartalmaznak. A repeat régiók, illetve az intronok jelenléte is hozzájárul a nagy genom mérethez.

Biológiai társulásokban az élőlények az élettér benépesítéséért ill. tápanyagokhoz való hozzájutásért folytatott kompetíció során különböző eszközöket fejlesztettek ki, az antagonista fajok elpusztítására. Ilyen eszköz lehet az általában a termelő törzzsel közeli rokonságban álló gombákat pusztító killer toxintermelés. Munkám során egy *P. anomala* törzs (VKM Y-159) killer toxinjának a jellemzését végeztük el. Az általunk vizsgált *P. anomala* törzs killer toxinját különböző *Candida* törzsek ellen teszteltük. A toxin különböző humán patogén *Candida* fajok ellen jó antagonista tulajdonságúnak bizonyult (pl: *C. norvegica*, *C. tropicalis, C. guilliermondii, C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. inconspicua, C. lypolitica, C. viswanathii*). Vannak azonban olyan *Candida* fajok, amik ellen nincs gátló hatás, így a toxin alkalmas lehet különböző *Candida* fajok tipizálására.

Meghatároztuk a toxintermelés optimális körülményeit: 4-es pH-jú komplett tápoldatban (YM4, YPD4) 20°C-on való tenyésztés bizonyult a legmegfelelőbbnek. *C. norvegica* ellen a toxin aktivitása pH függetlennek bizonyult a savas tartományban (pH 2-pH 6), míg *C. guilliermondii* ellenében csak pH 3-4 tartományban tapasztaltunk aktivitást, magasabb pH-n az aktivitás elveszett. Kísérleteinket követően elmondhatjuk, hogy a *P. anomala* VKM Y-159 törzs kétféle toxint termel: egy csak és kizárólagosan *C. norvegica* ellenes N toxint, illetve egy *C. norvegica* mellett számos egyéb *Candida* faj ellen aktív GN toxint. Mindkét toxin stabilnak bizonyult különböző hőmérsékleten történő inkubálást követően és viszonylag ellenállónak bizonyult proteináz K és pronáz E hatására is. Ezen eredmények után felmerült annak lehetősége, hogy a toxin nem fehérje, hanem lipid természetű. A toxin kémiai természetére irányuló kísérleteink alapján azonban a *P. anomala* GN toxinjáról nem lehet eldönteni, hogy lipid természetű-e vagy sem, míg a 10 kDa-nál kisebb N toxin esetén felmerül ennek lehetősége. A toxin hatásmódját élőcsíraszám meghatározásos módszerrel vizsgáltuk. A vizsgált toxinok cidikus hatásúak, ezt csészés kísérlettel és áramlási citometriás vizsgálatokkal is igazoltuk Az áramlás citometriás vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy egyik toxin sem a sejtciklust gátolja. Sejtfalkomponens affinitás vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy a GN toxin sejtfal receptora a β-1,6 D-glükán. A csak *C. norvegica* ellenes toxin egy- illetve kétértékű ionokkal inkubálva gátolható, azaz a toxinnak az érzékeny sejtekhez történő kapcsolódása általános ionos kölcsönhatáson alapszik. Ezeket az eredményeket a protoplasztokon végzett vizsgálatok is alátámasztották. Fehérje analízis során a GN toxin méretéről pontos adatot nem tudtunk meg, vagy a 6-14 kDa mérettartományban detektálható több fehérje egyike, vagy a 38-49 kDa mérettartományba esik. Oszlopkromatográfiás tisztítást követően nem zárhatjuk ki, hogy a toxin mérete a 62-98 kDa. UV mutagenezissel előállított nem termelő mutánsok extracelluláris fehérje mintázata nem különül el a vad típusétól, így nem tudtuk a toxint azonosítani SDS PAGE módszerrel. *P. anomala* sejtekben extrakromoszómális elemeket keresve PFGE technikával nem tudtunk kimutatni se plazmidot, se vírust, azaz elmondhatjuk a killer fenotípus kromoszómához kapcsolt.

6. Summary

Infections caused by *Candida* species are widespread throughout the world. *C. albicans* is the most important species encountered as a cause of both superficial and systemic infections. *C. albicans* has been found to be responsible for about 45-60% of human infections, with one of the highest rate (77-80%) observed in Hungary. Clinical manifestations of *C. albicans* include superficial infections such as cutaneous candidiasis, oropharyngeal candidiasis, and vulvovaginitis that are frequent but usually benign in immunocompetent hosts. They are able to cause severe infections including candidemia and disseminated candidiasis.

Information on the genetic diversity of *C. albicans* population is important in order to adapt prevention policies. Several typing techniques, including isoenzyme analysis, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, electrophoretic karyotyping and multilocus sequence typing (MLST) have been used for characterising *C. albicans* populations. Analysis of the mitochondrial DNA (mtDNA) of *C. albicans* has also been used successfully to detect intraspecific genetic variability. An existing mtDNA based typing method is the EO3 typing: the EO3 region (within the duplicated region in its stem-and-loop structure) exhibits a DNA-size polymorphism, yielding three fragment length types: L, M, and S. This polymorphism is due to the presence (or absence) of two small nucleotide sequences of about 50 bp (designated A and B) within the EO3 region: type L contains both A and B, type MI contains A alone, type MII contains B alone and type S possesses neither A nor B. The nucleotide segments A and B were encompassed by characteristic nucleotide sequence with a common inverted repeat structure. EO3 typing has epidemiological usefulness as an alternative tool for species-specific detection of *C. albicans*.

The occurrence and genetic variability of *Candida albicans* isolates in a Hungarian hospital was examined. Among the 103 *Candida* isolates, 44 (42.7%) proved to be *C. albicans*. The mitochondrial DNA profiles of these isolates were analysed. Total DNA purified from the strains were cut with restriction enzymes, which have plenty of recognition sites on nuclear DNA, and less on mitochondrial DNA (*Hae*III, *Hin*6I and *Hinf*I). No variability was detected in the RFLP pattern of the mitochondrial DNA by using *Hae*III. *Hin6*I-cleavage gave two, while the digestion with *Hinf*I resulted in four different patterns. The majority of the strains (23) were found to belong to the group labelled as type I. MtDNA types II and III include 11 and 9 strains, respectively, while type IV was exhibited only by a single isolate. The variability was also studied using isolated mtDNAs of selected isolates. The restriction enzymes were selected on the

basis of the frequency of their recognition sites. *Bgl*II and *Eco*RV have a numerous recognition sites on the mtDNA of *C. albicans.* Both of these enzymes gave distinct pattern on each type, supporting the results originated from total DNA digestion. Determining of the fragments' size we observed that the fragments of type III are identical to the fragments, after *in silico* digestion, of the mtDNA of the *C. albicans* strain SC5314, with mtDNA size of 40420 bp.

The *Pvu*II cleavage gave almost identical RFLP pattern in each type; only an appr. 50 bp difference could be detected in the molecular weight of the smallest double *Pvu*II fragments (position itself inside the repetitive region of the mtDNA). Primers were designed on this region, the fragment was amplified and sequenced. Results revealed a 55 bp deletion in Type I., II. and IV. comparing to Type III, in the upstream (intergenic) sequence of *cox3* gene. This *Pvu*II fragment contains the aforementioned EO3 region. We could manage to group our clinical isolates into the types Miyakawa and co-workers established: no. 5796 isolate (Type III.) belongs to L, no. 9132 (Type II.) and no. 10930 (Type I.) belongs to MII, while no. 17471 (Type IV.) is MI. Neither of the examined isolates represent type S. Sequencing revealed that the strain 9132 and 10930 lack the segment B, while strain 17471 lacks segment A, which contradicts with the RFLP profile of the region.

We generated the *Eco*RI-*Eco*RV physical maps of the mtDNAs of the four types (I: 10930, II: 9132, III: 5796, IV: 17471). The *Eco*RI pattern of the mtDNAs seemed identical (6 fragments in each type), whereas the *Eco*RV pattern is distinctive. *In silico*, we generated the *Eco*RI-*Eco*RV map of *C. albicans* strain SC5314 found in the database. This strain is identical to Type III, hence we use it as a basic map. The differences in the organization are due to point mutations (e.g. GAT/ATC–GGT/ATC), which led to the distinctive *Eco*RV patterns. Partial genetic map was also constructed with the following hybridization probes: *cox1, cox2, cox3, cob, nad1, nad2, nad4, nad5* and *atp6*. The hybridizations explored the same gene order in the four types, as in SC 5314 strain.

In order to analyze all the 44 clinical isolates, we chose a region, which differ in the four types corresponding to the *Eco*RV sites. The chosen FZRV region is involved in the largest *Eco*RI fragment, containing the end sequence of *srRNA*, an intergenic sequence and the whole *nad4l* gene (28321 bp–29888 bp). We designed primers to this region (FZRV) to amplify it. The PCR product (1551 bp) was digested with *Eco*RV. Type I contain no *Eco*RV site within this region (1551 bp), Type II. carries two *Eco*RV sites (920bp, 403 bp, 228 bp), while Type III and Type IV possess the same one *Eco*RV site (1323 bp, 228 bp), but Type IV could be differentiated

from Type III by *Bgl*II digestion. We examined the PCR-RFLP pattern of the FZRV region of several geographically distinct *C. albicans* isolates. The survey of PCR RFLP pattern of the region we chose to differentiate among clinical isolates is a good alternative epidemiological tool, beside the abovementioned EO3 region analysis.

The electrophoretic karyotypes of strains belonging to the different mtDNA types were analyzed. One additional chromosomal DNA band was detected in type II strains compared to the *C. albicans* 1006 strain. This band located between chromosomes number 3 and 4 (1.8 Mb and 1.7 Mb). Another well characterized *C. albicans* strain, WO-1 also carries an extra chromosome compared to strain 1006, however, the size of that chromosome (1.65 Mb) is different from that observed in mtDNA type II isolates (The *Candida albicans* physical map site; http://albicansmap.ahc.umn.edu/).

The yeast *C. parapsilosis* is an opportunistic human pathogen frequently associated with nosocomial disease in neonates and patients with diminished immunity. Contrary to *C. albicans, C. parapsilosis* has linear mitochondrial DNA with tandem repeats at the termini. Earlier study demonstrated the very stable RFLP pattern of the mtDNA within group I isolates of *C. parapsilosis*. Our survey on 23 Hungarian clinical isolates confirmed these results.

An international project was established to study the taxonomic relationship and the evolution of the mitochondrial genome in the *C. albicans* clade. In the frame of this project, we carried out the whole mt genome sequencing of the mtDNA of *C. maltosa*. At first, we generated the *Eco*RV-*Pst*I restriction map. We made random sequencing after physical breaking (nebulization) of the mtDNA. The sequences were aligned by software generating contigs by overlapping regions of the sequences. The remaining gaps were filled by primer walking technique. The size of the CBS 5611 mtDNA is 62949 base pairs and it is circular. It has the standard set of genes: *atp*6-8-9, *cox*1, *cox*2, *cox*3, *cob, nad1-2-3-4-4L-5-6*, *rns, rnl* and 26 tRNA. Three of the genes (*cox*1, *cob* and *rnl)* contain 2-2 introns. The genome contains two repeat regions: one is on the direct strand (12859-27237 nt); the other is on the complement strand (40937-55315 nt).

In every biocoenosis, competition for nutrients and space is one of the major factors that determine which organisms succeed and become established. Killer yeasts produce proteinaceous antimicrobial compounds (killer phenomenon), these are called mycocins. These are antifungal proteins whose activity is directed against organisms which are taxonomically related to mycocin producers. Some of the killer yeasts have antagonistic effect on human pathogen yeast species.

The toxin of the mycocinogenic yeast, *P. anomala* VKM Y-159 was characterized. We tested the inhibitory effect on several yeast strains: some human pathogen yeast are inhibited (*C. norvegica*, *C. tropicalis,C. guilliermondii, C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. inconspicua, C. lypolitica* and *C. viswanathii*), while others seemed to be resistant to the toxin. Therefore, the killer sensitivity pattern of this toxin can be a typing tool for discriminating several *Candida* species.

One of the most important conditions for toxin production is the pH of the culture medium. As a rule, mycocins are most active at pH 4-5. The optimal incubation temperature is 15–20°C for assaying of mycocinogenic activity. We propose, that this strain has two different toxins, one (N toxin) has inhibitory effect only against *C. norvegica*, the other (GN toxin) has broader spectrum. Killer activity is only expressed under acidic conditions: the anti-*C. norvegica* N toxin has activity at pH values between 2 and 6, while the GN toxin is active only on pH values 3 and 4. The toxins showed high stability up to 50°C. The toxins are stable against proteinase K and pronase E, suggesting that the toxins are either a small oligpeptide or a lipid. The lipidic nature can not been ruled out in the case of N toxin, which is smaller than 10 kDa. The cytocidic or cytostatic effect was investigated on *C. guilliermondii* and *C. norvegica* by means of plate assays and flow cytometric measures. The toxins have cidic activity, and neither of them arrest the cell cycle.

Several principal cell wall components can be involved in the binding of a killer toxin. In the case of GN toxin β-1,6 D-glucan (pustulane) is the receptor of the toxin, contrary to the most *Pichia sp.* toxin, while N toxin binds through general ionic interactions, especially via bivalent (e.g. Mg^{2+}) cations. To determine the size of the toxins, SDS PAGE method was used. The exact size of GN toxin was not yet defined, however it is either one of the detected proteins between 6-14 kDa, or it is a protein between 38-49 kDa. Chromatography experiments can not rule out the possible size of 62-98 kDa. The extracellular protein pattern of non killer mutants does not differ from the the pattern of the wild type.

The genetic base of the killer toxin was examined. Neither plasmid nor viral elements was found using PFGE technique. Mycocin production is presumed to be determined by nuclear genes, as in most *Pichia* species.

7. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Pfeiffer Ilonának, aki szakdolgozó korom óta irányítja és segíti munkámat. Köszönöm a laborban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét dr. Hamari Zsuzsannának és Karácsony Zoltánnak, hogy kifogyhatatlan tanácsaikkal és bíztatásukkal segítették munkámat. A fehérjemunkában nyújtott tanácsaikért köszönettel tartozom dr. Galgóczi Lászlónak, Takó Miklósnak, valamint dr. Varga Jánosnak és Kocsubé Sándornak, a különböző *Candida* fajok hozzáféréséért.

Köszönettel tartozom Dr. Vágvölgyi Csabának, hogy lehetővé tette dolgozatom elkészítését a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékén, valamint ezúton szeretnék köszönetet mondani a Tanszék összes dolgozójának, hogy munkájukkal és szakértelmükkel segítették dolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom dr. Márki-Zay Jánosnak az áramlási citometriás mérésekben nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom prof. Jozef Noseknek, aki lehetővé tette számomra a pozsonyi Comenius Egyetemen egy kéthónapos külföldi ösztöndíj eltöltését. Köszönöm továbbá Matus Valach-nak a rám fordított idejét és energiáját, amivel segítette munkámat Pozsonyban.

8. Irodalmi hivatkozások

Ahmed A, Sesti F, Ilan N, Shih TM, Sturley SL, Goldstein SA (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. Cell 99: 283-291.

Anderson, JB, Wickens, C, Khan, M, Cowen LE, Federspiel N, Jones T, Kohn LM, (2001). Infrequent genetic exchange and recombination in the mitochondrial genome of *Candida albicans*. Journal of Bacteriology 183: 865-872.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457-465.

Aragão PA, Oshiro ICV, Manrique EI, Gomes CC, Matsuo LL, Leone C, Moretti-Branchini ML, Levin AS (2001). *Pichia anomala* outbreak in a nursery: exogenous source? Pediatric Infectious Disease Journal 20: 843-848.

Avetisova SM (1991). Foundation of the purification method and biochemical characterization of cytochrome P450 of alkane-oxidizing yeast *Candida maltosa*. Dissertation, Moscow

Avis TJ, Belanger RR (2002). Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of Pseudozyma yeasts against plant-pathogenic fungi. FEMS Yeast Research 2: 5-8.

Backert S, Nielsen BL, Borner T (1997). The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. Trends in Plant Science 2: 477-483.

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. (2000). Yeasts. Characteristics and identification. Cambridge: University Press.

Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavicini FB & Viscoli C. (2006) Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. BMC Infectious Disease; 6: 21.

Bassetti M, Trecarichi EM, Righi E, Sanguinetti M, Bisio F, Posteraro B, Soro O, Cauda R, Viscoli C & Tumbarello M. (2007) Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. Diagnostic Microbiology Infectious Disease; 58: 325-331.

Bendich AJ (1993). Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. Current Genetics 24: 279-290.

Bevan EA, Markower M (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. In Proc. XIth International Congress of Genetics, pp. 202-203.

Blignaut, E., Pujol, C., Lockhart, S., Joly, S., Soll, D.R., (2002). Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive and healthy individuals reveals a new clade in South Africa. Journal of Clinical Microbiology 40: 826-836.

Boekhout T , Scorzetti G (1997). Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Medical and Veterinary Mycology 35: 147-149.

Boer PH and Gray MW (1988). Scrambled ribosomal RNA gene pieces in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. Cell 55: 399-411.

Bolen PL, Eastman EM, Cihak PL, Hayman GT (1994). Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPacl-2 of *Pichia acaciae* that shows similarity to a killer toxin gene of *Kluyveromyces lactis*. Yeast 10: 403-414.

Bonnerjera J, Oh S, Hoare M, Dunhill P (1986). The right step at the right time. Bio/Technology, 4: 954-958.

Boore JL (1999). Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Research 27: 1767-1780).

Bougnoux ME, Aanensen DM, Morand S, Theraud M, Spratt BG, d'Enfert C (2004). Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange andapplications. Infection, Genetics and Evolution. 4: 243-252.

Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C (2002). Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology 40: 1290-1297.

Burger G, Gray MW, Lang BF (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. Trends in Genetics 12: 709-716.

Bussey H, Boone C, Zhu H, Vernet T, Whiteway M, Thomas DY (1990). Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. Experientia 46: 193-200.

Buzzini P, Corazzi L, Turchetti B, Buratta M, Martini A (2004). Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from Williopsis saturnus DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. FEMS Microbiology Letters 238: 359-365.

Buzzini P, Turchetti B, Vaughan-Martini AE (2007). The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. FEMS Yeast Research 7: 749-760.

Cailliez JC, Séguy N, Aliouat EM, Polonelli L, Camus D, Dei-Cas E (1994). The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. Medical Hypotheses 43:167-171.

Camougrand N, Mila B, Velours G, Lazowska J, Guerin M (1988). Discrimination between different groups of *Candida parapsilosis* by mitochondrial DNA restriction analysis. Current Genetics 13: 445-449.

Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, Fernandez-Rodriguez M, Quindos G, Ponton J (1995). Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. Journal of Infectious Disease 171: 967-975.

Chakrabarti A, Singh K, Narang A, Singhi S, Batra R, Rao KLN, Ray P, Gopalan S, Das S, Gupta V, Gupta AK, Bose SM, McNeil MM (2001). Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in Northern India. Journal of Clinical Microbiology 39: 1702-1706.

Chen J, Rauch CA, White JH, Englund PT, Cozzarelli NR (1995). The topology of the kinetoplast DNA network. Cell 80: 61-69

Cheng Y, McNally DJ, Labbe C, Voyer N, Belzile F, Belanger RR (2003). Insertional Mutagenesis of a Fungal Biocontrol Agent Led to Discovery of a Rare Cellobiose Lipid with Antifungal Activity. Applied and Environmental Microbiology 69: 2595-2602.

Clayton DA (2000). Vertebrate mitochondrial DNA - a circle of surprises. Experimental Cell Research 255: 4-9

Corte L, Lattanzi M, Buzzini P, Bolano A, Fatichenti F, Cardinali G (2005). Use of RAPD and killer toxin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* strain typing. Journal of Applied Microbiology 99: 609-617.

Cummings DJ, McNally KL, Domenico JM, Matsuura ET (1990). The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. Current Genetics. 17: 375-402

Dalle F, Franco N, Lopez J et al (2000). Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. Journal of Clinical Microbiology 38: 45544559

Davis BJ (1964). Disk. electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. Annals of the New York Academy of Sciences.

Deák R, Bodai L, Aarts HJ, Maráz A. (2004) Development of a novel, simple and rapid molecular identification system for clinical Candida species. Medical Mycology 42(4): 311-8.

de Hoog GS (1996). Risk assessment of fungi reported from humans and animals. Mycoses 39: 407-417.

Diezmann S, Cox CJ, Shönian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG (2004). Phyolgeny and Evolution of Medical Species of Candida and Related Taxa: a Multigenic Analysis. Journal of Clinical Microbiology Vol. 42, No. 12, 5624-5635.

Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology. 39: 14–23.

Dinouel N, Drissi R, Miyakawa I, Sor F, Rousset S, Fukuhara H (1993). Linear mitochondrial DNAs of yeasts: closed-loop structure of the termini and possible linear-circular conversion mechanisms. Molecular and Cell Biology 13:2315-2323

Dóczi I, Dósa E, Hajdú E, Nagy E. (2002). Aetiology and antifungal susceptibility of yeast bloodstream infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2000. Journal of Medical Microbiology 51: 677-681.

Druvefors U, Jonsson N, Boysen ME, Schnürer J (2002). Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. FEMS Yeast Research 2, 389-394.

Edqvist J, Burger G, Gray MW (2000). Expression of mitochondrial protein-coding genes in *Tetrahymena pyriformis*. Journal of Molecular Biology. 297: 381–393.

Eloy O, Marque S, Botterel F et al (2006). Uniform distribution of three *Candida albicans* microsatellite markers in two French ICU populations supports a lack of nosocomial cross-contamination. BMC Infectious Diseases 6: 162

El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Mycoscience 47: 25-35

Embley, TM, van der Giezen, M, Horner, DS, Dyal, PL & Foster, P. (2003). Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 358: 191-201.

Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology 38, 1008-1015.

Enright MC, Spratt BG, Kalia A, Cross JH, Bessen DE (2001). Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. Infection and Immunity 69: 2416-2427.

Feng Pan, Qingxiang Yang, Yu Zhang, Shujun Zhang, MinYang (2004). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pichia anomala*. Biotechnology Letters 26: 803-806.

Finkler A, Peery T, Tao J, Bruenn J, Koltin I (1992). Immunity and resistance to the KP6 toxin of *Ustilago maydis*. Molecular and General Genetics MGG 233: 395-403.

Fleet GH. Cell walls. In: Rose AH, Harrison JS, editors; Rose AH, Harrison JS, editors. The yeasts. 4. Yeast organelles. London, England: Academic Press; 1991. pp. 200-277.

Fleet GH (1992). Spoilage yeasts. Critical Review of Biotechnology 12: 1-44.

Foury F, Roganti, T, Lecrenier, N, Purnelle, B (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters 440: 325-331.

Fukuhara H, Sor F, Drissi R, Dinouel N, Miyakawa I, Rousset S, Viola AM (1993). Linear mitochondrial DNAs of yeasts: frequency of occurrence and general features. Molecular and Cell Biology 13: 2309-2314.

Ganter PF, Stammer WT (1992). Killer factors as a mechanism of interference competition in yeasts associated with Cacti. Ecology. 73(1): 54-67.

Garcia-Hermoso D, Cabaret O, Lecellier G et al (2007). Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-based typing of *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology 45: 3958-3963.

Giaever G et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. Nature 418: 387-391

Goddard JM, Cummings DJ (1975). Structure and replication of mitochondrial DNA from *Paramecium aurelia*. Journal of Molecular Biology 97: 593-609.

Golubev WI, Boekhout T (1995). Sensitivity to killer toxin as a taxonomic tool among heterobasidiomycetous yeasts. Studies in Mycology 38: 47-58.

Golubev WI, Ikeda R, Shinoda T (1997). Antifungal acticity of *Bullera alba* (Hanna) Derx. Mycoscience 38: 25-29.

Golubev WI, Kulakovskaya TV and Golubeva EW (2001). Antifungal glycolipid production in *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821 (in Russian). Mikrobiologiya 70: 642-646.

Golubev WI, Pfeiffer I, Golubeva E (2002). Mycocin in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. FEMS Microbiology Ecology 10: 151-157.

Golubev WI, Pfeiffer I, Churkina LG (2003). Double-stranded RNA viruses in a mycocinogenic strain of *Cystofilobasidium infirmominiatum*. FEMS Yeast Research 3: 63-68.

Golubev WI, Gadanho M, Sampaio JP, Golubev NW (2003). *Cryptococcus nemorosus* sp. nov. and *Cryptococcus perniciosus* sp. nov., related to Papiliotrema Sampaio

et al. (Tremellales). International Journal of *Systematic and Evolutionary* Microbiology 53: 905-911.

Golubev WI, Kulakovskaya TV, Kulakovskaya EV, Golubev NV (2004). The fungicidal activity of an extracellular glycolipid from *Sympodiomycopsis paphiopedili* Sugiyama et al. Mikrobiologiya 2004, 73, 6, 841-845 (in Russian).

Golubev WI (2006). Antagonistic interactions among yeasts. In The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, 197-219 [CA Rosa and Peter G., editors]. Berlin, Germany: Springer.

Gomi K, Horiguchi S (1988). Purification and characterization of pyrocatechase from the catechol assimilating yeast *Candida maltosa*. Agricultural and Biological Chemistry 52: 585-587.

Goto K, Iwatuki Y, Kitano K, Obata T, Hara S (1990). Cloning and nucleotide sequence of the KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Agricultural and Biological Chemistry 54: 979-984.

Graser Y, Volovsek M, Arrington J, Schonian G, Presber W, Mitchell TG, Vilgalys R, (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. PNAS 93: 12473–12477.

Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Brossard N, Delage E, Littlejohn TG, Plante I, Rioux P, Saint-Louis D, Zhu Y, Burger G (1998). Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. Nucleic Acids Research 26: 865-878.

Gri□ths AJ (1995). Natural plasmids of filamentous fungi. Microbiological Reviews 59: 673-685

Groves DP, Clare JJ, Oliver SG (1983). Isolation and Characterisation of a Double-Stranded RNA Virus-Like Particle *from the* Yeast *Yarrowia lipolytica*. Current Genetics 7: 185-190.

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. Journal of Bacteriology 145: 382-390.

Hamari Zs, Pfeiffer I, Ferenczy L, Kevei F (1999). Interpretation of variability of mitochondrial genomes in the species *Aspergillus carbonarius*. Antonie van Leeuwenhoek 75: 225–231.

Hayman GT, Bolen PL (1991). Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. Current Genetics 19: 389-393.

Hazan R, Levine A, Abeliovich H (2004). Benzoic Acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellularmembrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology 70: 44494457.

Hazen KC (1995). New and emerging yeast pathogens. Clinical Microbiology Reviews 8: 462-478.

Heard GM, Fleet GH (1987). Occurrence and Growth of Killer Yeasts during Wine Fermentation. Applied and Environmental Microbiology 53: 2171-2174.

Hodgson VJ, Button D,Walker GM (1995). Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. Microbiology 141: 2003–2012.

Hull CM, Johnson AD (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. Science 285: 1271–1275.

Hutchins K, Bussey H (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1→6)-β-d-glucan. Journal of Bacteriology 154: 161-169.

Izgü F, Altinbay D (2004). Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo-beta-1,3-glucanase. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 68: 685-693.

Izgü F, Altınbay D, Sertkaya A (2005). Enzymic activity of the K5-type yeast killer toxin and its characterization. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 69: 2200-2206.

Izgü F, Altınbay D, Acun T (2006). Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo-ß-1,3-glucanase activity. Enzyme and Microbial Technology 39: 669-676.

Izgü F, Altınbay D, Tureli AE (2006). In vitro activity of panomycocin, a novel exo-b-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. Mycoses 50: 31-34.

Jablonowski D, Schaffrath R (2007). Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. Biochemical Society Transactions 35: 1533-1537.

Jablonowski D, Fichtner L, Martin VJ, Klassen R, Meinhardt F, Stark MJ, Schaffrath R (2001). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall chitin, the *Kluyveromyces lactis* zymocin receptor. Yeast 18: 1285-1299.

Jakobsen M, Narvhus J (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. International Dairy Journal 6: 755-768.

Jijakli MH, Lepoivre P (1998). Characterization of an exo-β-1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. Phytopathology 88: 335-343.

Johnson EA (2003). *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. International Microbiology 6: 169-174.

Jonsson A, Pahlow G (1984). Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. Animal Research and Development 20: 7-22.

Kagan BL (1983). Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. Nature 302: 709-711.

Kagiyama S, Aiba T, Kadowaki K, Mogi K (1988). New killer toxin of halophilic *Hansenula anomala*. Agricultural Biology and Chemistry. 52: 1-7.

Kalenic S, Jandrlic M, Vegar V, Zuech N, Sekulic A, Mlinaric-Missoni E (2001). *Hansenula anomala* outbreak at a surgical intensive care unit: A search for risk factors. European Journal of Epidemiology 17: 491-496.

Karamysheva ZN, Ksenzenko VN, Golubev WI, Ratner EN, Tikhomirova LP (1991) Characterization of viruses in the mycocinogenic strain of *Cystofilobasidium bisporidi*i VKM Y-2700. Dokl Ross Akad Nauk 331:376–378.

Kasahara S, Inoue SB, Mio T, Yamada T, Nakajima T, Ichisima E, Furuichi Y, Yamada H (1994). Involvement of cell wall β-glucan in the action of HM-1 killer toxin. FEBS Letters 348: 27-32.

Kashiwagi T, Kunishima N, Suzuki C, Tsuchiya F, Nikkuni S, Arata Y, et al. (1997). The novel acidophilic structure of the killer toxin from halotolerant yeast

demonstrates remarkable folding similarity with a fungal killer toxin. Structure 5: 81–93.
Kennell JC,. Moran JV, Perlman PS, Butow RA, Lambowitz AM (1993). Reverse transcriptase activity associated with maturase-encoding group II introns in yeast mitochondria Cell, Volume 73, Issue 1, 9 April 1993, Pages 133-146
Kevei F, Kucsera J, Varga J, Vágvölgyi Cs (1999). Fejezetek a mikológiából. JATEPress, Szeged
Kimura T, Kitamoto N, Matsuoka K, Nakamura K, Iimura Y, Kito Y (1993). Isolation and nucleotide sequences of the genes encoding killer toxins from *Hansenula mrakii* and *H. saturnus*. Gene 137: 265-270.
Kirk PM, Cannon PF, David JC, Staplers JA (ed.) (2001). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 9th ed. CABI Publishing.
Kitamoto HK, Hasebe A, Ohmomo S, Suto EG, Muraki M, Iimura Y (1999). Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified killer yeast, *Kluyveromyces lactis*, defective in the ability to grow on lactic acid. Applied and Environmental Microbiology 65: 4697–4700.
Klassen R, Jablonowski D, Stark MJ, Schaffrath R, Meinhardt F (2006). Mating-type locus control of killer toxins from *Kluyveromyces lactis* and *Pichia acaciae*. FEMS Yeast Research 6: 404-413.
Klassen R, Krampe S, Meinhardt F (2007). Homologous recombination and the yKu70/80 complex exert opposite roles in resistance against the killer toxin from *Pichia acaciae*. DNA Repair (Amst) 6: 1864-1875.
Kollár R, Petrásková E, Ashwell G, Robbins PW, Cabib E (1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and β(1→3)-glucan. Journal of Biological Chemistry 270: 1170-1178.
Koltin Y, Levine R, Peery T (1980). Assignment of functions to segments of the DsRNA genome of the Ustilago virus. Molecular Genetics and Genomics 178: 173-178.
Kosa P, Valach M, Tomaska L, Wolfe KH, Nosek J (2006). Complete DNA sequences of the mitochondrial genomes of the pathogenic yeasts *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*: insight into the evolution of linear DNA genomes from mitochondrial telomere mutants. Nucleic Acids Research, Vol. 34, No. 8: 2472-2481.
Koszul R, Malpertuy A, Frangeul L, Bouchier C, Wincker P, Thierry A, Duthoy S, Ferris S, Hennequin C, Dujon B (2003). The complete genome sequence of the pathogenic yeast *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata*. FEBS Letters 534: 39-48.
Kovac L, Lazowska J, Slonimski PP (1984). A yeast with linear molecules of mitochondrial DNA. Molecular Genomics and Genetics 197: 420-424.
Kovalenko OG, Korobko OP, Korbelainen ES, Barkalova AO, Telegeva TA, Papp VT (1992). Effect of mannan from *Candida maltosa* and its sulphated derivatives on plant susceptibility to viral and bacterial infections (in Russian). Mikrobiol Zh (Kiev) 54: 63-69
Kucsera J, Ferenczy L (1986). Interspecific hybridisation between *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. FEMS Microbiol Letters 36: 315-318.
Kuroiwa T (1982). Mitochondrial nuclei. International Review of Cytology 75: 1-59
Kurtzman CP, Fell JW (1998). The yeast, a taxonomical study. 4th edition. Elsevier Science B. V. Amsterdam, The Netherlands. 1055 pp.

Kurtzman CP (1998). Pichia E.C. Hansen emend. Kurtzman. In The Yeast, a Taxonomic Study. Edited by Kurtzman CP, Fell JW. Elsevier Science B. V. Amsterdam, The Netherlands. 273-352. pp.

Lacey J, Magan N (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relations. In Cereal grain - Mycotoxins, fungi and quality indrying and storage. Edited by J. Chelkowski. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands. 77-118. pp.

Láday M, Pfeiffer I, Kucsera J et al. (2001). One-day ready-to-use fungal mitochondrial DNA preparation. BioTechniques 30: 1232-3.

Lanciotti R., Sinigaglia M, Gardini F, Guerzoni ME (1998). *Hansenula anomala* as spoilage agent of cream-filled cakes. Microbiological Research 153: 145-148.

Lander ES et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409: 860-921.

Lang BF, Gray MW, Burger G (1999). Mitochondrial Genome Evolution And The Origin of Eukaryotes. Annual Review Genetics 33: 351-397.

Langkjaer RB, Casaregola S, Ussery DW, Gaillardin C, Piskur J (2003). Sequence analysis of three mitochondrial DNA molecules reveals interesting differences among Saccharomyces yeasts. Nucleic Acids Research Vol. 31, No. 12: 3081-3091.

Leach J, Finkelstein DB, Rambosek JA (1986). Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. Fungal Genetics Newsletters 33: 32-33.

Ligon JM, Bolen PL, Hill DS, Bothast RJ, Kurtzman CP (1989). Physical and biological characterization of linear DNA plasmids of the yeast *Pichia inositovora*. Plasmid 21: 185-194.

Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF (1995). Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. Journal of Clinical Microbiology 33: 1815-1821.

Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Dickema DJ (2008). *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream Infections. Journal of Clinical Microbiology Vol. 46, No. 1: 374-376.

Lopes CA, Lavalle TL, Querol A, Caballero AC (2006). Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. Antonie Van Leeuwenhoek 89: 147-156.

Lott TJ, Holloway BP, Logan DA, Fundyga R, Arnold J (1999). Towards understanding the evolution of the human commensal yeast *Candida albicans*. Microbiology 145: 1137-1143.

Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT (2002). Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. Eukaryotic Cell 1: 495-502

Luo G, Mitchell TG (2002). Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 40: 2860-2865

Lupetti A, Guzzi G, Paladini A, Swart K, Campa M, Senesi S (1995). Molecular karyotyping of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carriers. Journal of Clinical Microbiology 33: 1238-1242.

Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L (1997). Yeast killer systems. Clinical Microbiology Reviews 10: 369-400.

Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. PNAS 95: 3140-3145.

Marquina D, Santos A, Pienando JM (2002). Biology of killer yeasts. International Microbiology 5(2): 65-71.

Masih EI, Alie I, Paul B (2000). Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? FEMS Microbiology Letters 189: 233-237.

McCluskey K, Russel BW, Mills D (1990). Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplasts. Current Genetics 18: 385-386.

Messer SA, Jones RN, Fritsche TR (2006). International surveillance of *Candida spp.* and *Aspergillus spp*.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). Journal of Clinical Microbiology 44: 1782-1787.

Michalcakova S, Sulo P, Slavikova E (1993). Killer Yeasts of Kluyveromyces and Hansenula Genera with Potential Application in Fermentation and Therapy. Acta Biotechnologica 13: 341-350.

Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jiménez JM, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Rodríguez-Vico F (2003). Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19: 297-304.

Mitchell TG, Perfect JR (1995). Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clinical Microbiology Reviews 8: 515-548.

Miyakawa Y, Mabuchi T (1994). Characterization of a species-specific DNA fragment originating from the *Candida albicans* mitochondrial genome. Journal of Medical and Veterinary Mycology 32: 71-75

Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y (1993). New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 31: 3344-3347

Miyakawa Y, Mabuchi T, Kagaya K et al (1992) Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 30(4): 894-900.

Miyakawa Y, Ozawa T (2009). A New Type of DNA Polymorphism Identified in the Species-Specific DNA Region Originating from the *Candida albicans* Mitochondrial Genome. Current Microbiology 58: 438-442.

Miyakawa Y, Ozawa T. (2009). Simple Method to Accurately Differentiate *Candida albican*s Isolates Concurrently Using Polymorphic Patterns of PCR-Amplified, Species-Specific Nuclear and Mitochondrial Targets. Current Microbiology 58: 164-169.

Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, PlaConcha Gil J, Sánchez-Pérez M, Nombela C (1998). *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. International Microbiology 1: 95-106.

Mollapour M, Piper PW (2001). The ZbYME2 gene from the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* confers not only YME2 functions in *Saccharomyces*

cerevisiae, but also the capacity for catabolism of sorbate and benzoate, two major weak organic acid preservatives. Molecular Microbiology 42: 919-930.
Moraes CT (2001). What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? Trends in Genetics 17: 199-205.
Morin GB, Cech TR (1986). The telomeres of the linear mitochondrial DNA of *Tetrahymena thermophila* consist of 53 bp tandem repeats. Cell 46: 873-883.
Morin GB, Cech TR (1988). Mitochondrial telomeres: surprising diversity of repeated telomeric DNA sequences among six species of *Tetrahymena*. Cell 52: 367-374.
Nallapareddy SR, Duh RW, Singh KV, Murray BE (2002). Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology 40: 868.876.
Nedelcu AM, Lee RW, Lemieux C, Gray MW, Burger G (2000). The complete mitochondrial DNA sequence of *Scenedesmus obliquus* reflects an intermediate stage in the evolution of the green algal mitochondrial genome. Genome Research 10: 819-831.
Nosek J, Dinouel N, Kovac L, Fukuhara H (1995). Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. Molecular Genomics and Genetics 247: 61-72.
Nosek J, Tomaska L, Fukuhara H, Suyama Y, Kovac L (1998). Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. Trends in Genetics 14: 184-188.
Nosek J, Tomaska L, Pagacova B, Fukuhara H (1999). Mitochondrial telomere-binding protein from *Candida parapsilosis* suggests an evolutionary adaptation of a nonspecific single-stranded DNA-binding protein. Journal of Biological Chemistry 274: 8850-8857.
Nosek J, Novotna M, Hlavatovicova Z, Ussery DW, Fajkus J, Tomáška L (2004). Complete DNA sequence of the linear mitochondrial genome of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Molecular Genetics and Genomics 272: 173-180.
Nosek J, Rycovska A, Makhov AM, Griffith JD, Tomáška L (2005). Amplification of Telomeric Arrays via Rolling-circle Mechanism. The Journal of Biological Chemistry Vol. 280, No. 11: 10840-10845.
Nosek J, Tomáška L, Ryčovská A, Fukuhara H (2002). Mitochondrial Telomeres as Molecular Markers for Identification of the Opportunistic Yeast Pathogen *Candida parapsilosis*. Journal of Clinical Microbiology Vol. 40, No. 4: 1283-1289.
Nosek J, Tomáška L (2003). Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. Current Genetics 44: 73-84.
Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, Jacobsen MD, Lecomte M, Li SY, Tavanti A, Maiden MC, Gow NA, D'Enfert C (2007). Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. Eukaryotic Cell 6: 1041-1052.
Okpodu CM, Robertson D, Boss WF, Togasaki RK, Surzycki SJ (1994). Rapid isolation of nuclei from carrot suspension culture cells using a BioNebulizer. Biotechniques 16(1): 154-9.
Palpacelli V, Ciani M, Rosini G (1991). Activity of different 'killer' yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. FEMS Microbiology Letters 68: 75-78.

Papadimitriou MNB, Resende C, Kuchler K, Brul S (2007). High Pdr12 levels in spoilage yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) correlate directlywith sorbic acid levels in the culture medium but are not sufficient to provide cells with acquired resistance to the food preservative. International Journal of Food Microbiology 113: 173-179.

Petersson S, Schnürer J (1995) Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii,* and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Enviromental Microbiology 61(3): 1027-1032.

Petersson S, Schnürer J (1998). *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high-moisture wheat, rye, barley, and oats stored under airtight conditions. Canadian Journal of Microbiology 44: 471-476.

Pfaller MA, Diekema DJ (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clinical Microbiology Reviews 20: 133-163.

Pfeiffer I, Gyantár M, Kucsera J, Párducz Á (1998). Isolation of dsRNA-associated VLPs from the strain *Cryptococcus hungaricus* CBS 6569. FEMS Microbiology Letters, Volume 162, Issue 1, Pages 151-154

Pfeiffer I, Kucsera J, Gácser A (2002). Diversity of extrachromosomal genetic elements in yeasts. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 49: 315-319.

Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. Science 292: 504-507.

Pfeiffer I, Golubev W, Farkas Z (2004). Mycocin production in *Cryptococcus aquaticus*. Antonie van Leeuwenhoek 86(4): 369-375.

Pintar J, Starmer WT (2003). The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. Antonie Van Leeuwenhoek 83: 89-97.

Piškur J, Smole S, Groth C, Petersen RF, Pedersen MB (1998). Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus Saccharomyces. International Journal of Bacteriology 48: 1015-1024.

Pitt JI, Hocking AD (1997). Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London.

Polonelli L, Lorenzini R, De BF, Morace G (1986). Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. Mycopathologia 96: 103-107.

Polonelli L, Castagnola M, Rossetti DV, Morace G (1985). Use of killer toxins for computer-aided differentiation of *Candida albicans* strains. Mycopathologia 91: 175-179.

Presterl E, Daxböck F, Graninger W, Willinger B (2007). Changing pattern of candidaemia 2001-2006 and use of antifungal therapy at the University Hospital of Vienna, Austria. Clinical Microbiology and Infection 13: 1072-1076.

Pritchard AE, Cummings DJ (1981). Replication of linear mitochondrial DNA from *Paramecium*: sequence and structure of the initiation-end crosslink. PNAS 78: 7341-7345.

Puchkov EO, Zahringer U, Lindner B, Kulakovskaya TV, Seydel U, Wiese A (2002). The mycocidal, membrane-active complex of *Cryptococcus humicola* is a new type of cellobiose lipid with detergent features. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1558: 161-170.

Pujol C, Dodgson AR, Soll DR (2005). Population genetics of ascomycetes pathogenic to humans and animals. In: Xu, J. (Ed.), Evolutionary Genetics of Fungi. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, pp. 149-188.

Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR (1997). Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and southern blot hybridation with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology 35: 2348-2358.

Pujol C, Joly S, Nolan B, Srikantha R, Lockhart S, Soll D. (1999). Microevolutionary changes in *Candida albicans* identified parle complex Ca3 probe involve insertions and deletions of RPS units at specific genomic sites. Microbiology 145: 2635–2644.

Pujol C, Reynes J, Renaud F, Raymond M, Tibayrenc M, Ayala FJ, Janbon F, Mallie M, Bastide JM (1993). The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. PNAS 90: 9456-9459.

Radler F, Schmitt M J, Meyer B (1990). Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. Archives of Microbiology 154: 175-178.

Regev A, Cohen S, Cohen E, Bar-Am I, Lavi S (1998). Telomeric repeats on small polydisperse circular DNA (spcDNA) and genomic instability. Oncogene 17: 3455-3461.

Reiss E, Obayashi T, Orle K et al (2000). Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. Medical Mycology 38(suppl 1): 147-159.

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, the National Nosocomial Infections Surveillance System & Gaynes RP. (2000) Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. Infection control and Hospital Epidemiology; 21 (8): 510-515.

Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. International Journal of Food Microbiology 86: 181-188.

Roy B, Meyer SA (1998). Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. Journal of Clinical Microbiology 36: 216-218.

Ryan R, Grant D, Chiang KS, Swift H (1978). Isolation and characterization of mitochondrial DNA from *Chlamydomonas reinhardtii*. PNAS 75: 3268-3272.

Rycovska A, Valach M, Tomáška L, Bolotin-Fukuhara M, Nosek J (2004). Linear versus circular mitochondtial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. Microbiology 150: 1571-1580.

Safdar A, Perlin DS & Armstrong D. (2002) Hematogenous infections due to Candida parapsilosis: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 44: 11-16.

Sambrook J, Fritsch EFMT (1989). Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Haukland HH, Mannsaker T, Gaustad P (2006). Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. Journal of Clinical Microbiology 44: 1977-1981.

Santos A, Marquina D, Leal JA, Peinado JM (2000). ß-1,6-D-Glucan as Cell Wall Receptor for *Pichia membranifaciens* Killer Toxin. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66, No. 5: 1809-1813.

Sawant AD, Abdelal AT, Ahearn DG (1989). Purification and characterization of the anti-Candida toxin of *Pichia anomala* WC 65. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33: 48-52.

Sawant AD, Abdelal AT, Ahearn DG (1988). Anti-Candida activity of *Pichia anomala* determined by a growth rate reduction assay. Applied and Environmental Microbiology 54: 1099-1103.

Schmitt M, Radler F (1987). Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. Journal of General Microbiology 28: 3347-3354.

Schmitt MJ, Breinig F (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. FEMS Microbiology Reviews 26: 257-276.

Schmitt MJ, Neuhausen F (1994). Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. Journal of Virology 68: 1765-1772.

Schmitt MJ, Klavehn P, Wang J, Schonig I, Tipper DJ (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. Microbiology 142 (Pt 9): 2655-2662.

Seguy N, Polonelli L, Dei-Cas E, Cailliez JC (1998). Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to Pneumocystis. Perspectives in the control of pneumocystosis. FEMS Immunology and Medical Microbiology 22: 145-149.

Sesti F, Shih TM, Nikolaeva N, Goldstein SA (2001). Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. Cell 105: 637-644.

Shaw JA, TroutmanWB, Lasker BA et al (1989). Characterization of the inverted duplication in the mitochondrial DNA of *Candida albicans*. Journal of Bacteriology 171: 6353-6356.

Sherratt HS (1991). Mitochondria: structure and function. Revue Neurologique (Paris) 147: 417-430.

Shukla GC, Nene V (1998). Telomeric features of *Theileria parva* mitochondrial DNA derived from cycle sequence data of total genomic DNA. Molecular and Biochemical Parasitology 95: 159-163.

Simpson L (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annual Review of Microbiology 41: 363-382.

Soll DR, Pujol C (2003). *Candida albicans* clades. FEMS Immunology and Medical Microbiology 39: 1-7.

Spencer JFT, Ragout de Spencer AL, Laluce C (2002). Non-conventional yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology 58: 147-156.

Spencer JFT, Spencer DM, Tulloch AP (1979). Extracellular glycolipids of yeasts. In Economic microbiology, vol 3. Secondary products of metabolism, pp. 523-540 [Rose AH, editor]. London: Academic.

Stark MJ, Boyd A, Mileham AJ, Romanos MA (1990). The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. Yeast 6: 1-29.

Stark MJ, Boyd A (1986). The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. EMBO Journal 5: 1995-2002.

Starmer WT, Ganter PF, Aberdeen V, Lachance MA, Phaff HJ (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. Canadian Journal of Microbiology 33: 783-796.

Steinlauf R, Peery T, Koltin Y, Bruenn J (1988). The *Ustilago maydis* virus-encoded toxin-Effect of KP6 on sensitive cells and spheroplasts. Experimental Mycology 12: 264-274.

Stephan F, Bah MS, Desterke C et al (2002). Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. Clinical Infectious Disease 35: 1477-1483.

Stratford, M (2006). Food and beverage spoilage yeasts. In: Querol A, Fleet GH (Eds.), Yeasts in Food and Beverage. Springer, Berlin, pp. 335-379.

Su CS, Meyer SA (1989). Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from *Candida parapsilosis* and other Candida species. Yeast. Spec No: S355-60.

Su CS, Meyer SA (1991). Characterization of mitochondrial DNA in various Candida species: isolation, restriction endonuclease analysis, size, and base composition. International Journal of Systematic Bacteriology 41(1): 6-14.

Sujaya IN, Antara NS, Sone T, Tamura Y, Aryanta WR, Yokota A, Asano K, Tomita F (2004). Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 143-150.

Suyama Y, Miura K (1968). Size and structural variations of mitochondrial DNA. PNAS 60: 235-242.

Suzuki C, Nikkuni S (1994). The Primary and Subunit Structure of a Novel Type Killer Toxin Produced by a Halotolerant Yeast, *Pichia farinosa*. The Journal of Biological Chemistry Vol. 269, No. 4: 3041-3046.

Takano H, Kawano S, Kuroiwa T (1994). Complex terminal structure of a linear mitochondrial plasmid from *Physarum polycephalum*: three terminal inverted repeats and an ORF encoding DNA polymerase. Current Genetics 25: 252-257.

Takasuka T, Komiyama T, Furuichi Y, Watanabe T (1995). Cell wall synthesis specific cytocidal effect *of Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. Cellular and Molecular Biology Research 41: 575-581.

Takita MA, Castilho-Valavicius B (1993). Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. Yeast 9: 589-598.

Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. Journal of Clinical Microbiology Vol. 43, No. 1: 284-292.

Tavanti A, Davidson AD, Fordyce MJ, Gow NA, Maiden MC, Odds FC (2005). Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. Journal of Clinical Microbiology 43: 5601-5613.

Tavanti A, Gow NA, Maiden MC, Odds FC, Shaw DJ (2004). Genetic evidence for recombination in *Candida albicans* based on haplotype analysis. Fungal Genetics and Biology 41, 553–562.

Tavanti A, Gow NAR, Senesi S, Maiden MJ, Odds FC (2003). Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology 41: 3765-3776.

Thuler LCS, Faivichenco S, Velasco E, Martins CA, Nascimento CRG, Castilho I (1997). Fungaemia caused by *Hansenula anomala* - an outbreak in a cancer hospital. Mycoses 40: 193-196.

Tokuoka K, Ishitani T, Goto S, Komagata K (1985). Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. Journal of General and Applied Microbiology 31: 411-427.

Tomaska L, Nosek J, Fukuhara H (1997). Identification of a putative mitochondrial telomere-binding protein of the yeast *Candida parapsilosis*. Journal of Biological Chemistry 272: 3049-3056.

Tomaska L,Makhov AM, Nosek J, Kucejova B, Gri□th JD (2001). Electron microscopic analysis supports a dual role for the mitochondrial telomere-binding protein of *Candida parapsilosis*. Journal of Molecular Biology 305: 61-69.

Tomáška L, Makhov AM, Griffith JD, Nosek J (2002). T-loops in yeast mitochondria. Mitochondrion 1: 455-459.

Tomáška L, Nosek J, Kucejová B (2001) Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Proteins: in Search for New Functions. Biological Chemistry Vol. 382: 179-186.

Tomáška L, Nosek J, Makhov AM, Pastorakova A, Griffith JD (2000). Extragenomic double-stranded DNA circles in yeast with lineal mitochondrial genomes: potential involvement in telomere maintenance. Nucleic Acid Research Vol. 28, No. 22: 4479-4487.

Uemura N (1985). Industrialization of the production of dibasic acids from paraffins using microorganisms (in Japanese). Hakko to Kogyo 43: 436-441.

Uemura N, Taoka A, Takagi M (1988). Production of dicarboxyic acids by fermentation. In: Applewhite TH (ed) World conference on biotechnology for the fats and oils industry. American Oil Chemists Society, Champaign, Ill. pp 148-152.

Umemura I, Yanagiya K, Komatsubara S, Sato T, Tosa T (1990). D-Alanine production by using asymmetric degrading activity of Candida maltosa. Annals of the New York Academy of Sciences 613: 659-662.

Vágvölgyi C*,* Papp T*,* Palágyi Z*,* Michailides TJ (1996). Isozyme variation among isolates of *Mucor piriformis.* Mycology 88 (4): 602-607

Vahrenholz C, Riemen G, Pratje E, Dujon B, Michaelis G (1993). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. Current Genetics 24: 241-247.

Venter J.C. et al. (2001). The sequence of the human genome. Science 291: 1304-1351.

Viljoen BC (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. International Journal of Food Microbiology 69: 37-44.

Walther TC, Kennell JC (1999). Linear mitochondrial plasmids of *F. oxysporum* are novel, telomere-like retroelements. Molecular Cell 4: 229-238.

Wang L, Yue LX, Chi ZM, Wang XH (2008). Marine killer yeasts active against the pathogenic yeast strain in crab (Portunus trituberculatus). Diseases of Aquatic Organisms 80: 211-8.

Weems JJ (1992). *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clinical Infectious Disease 14: 756-766.

Weiler F, Schmitt MJ (2003). Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its e!ect on sensitive fungal cells. FEMS Yeast Research 3: 69-76.

Wésolowski M, Fukuhara H (1981). Linear mitochondrial deoxyribonucleic acid from the yeast *Hansenula mrakii*. Molecular Cell Biology 1: 387-393.

Wickner RB (1996). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology Reviews 60: 250-265.

Williamson D (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. Nature Reviews Genetics 3: 475-481.

Wills JW, Troutman WB, Riggsby WS (1985). Circular mitochondrial genome of *Candida albicans* contains a large inverted duplication. Journal of Bacteriology 164: 7-13.

Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP et al (2003). Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. Clinical Infectious Disease 36: 1103-1110.

Woods DR, Bevan EA (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology 51: 115-126.

Worsham PL, Bolen PL (1990). Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. Current Genetics 18: 77-80.

Yeo SF, Wong B (2002). Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clinical Microbiology Reviews 15: 465-484.

Young TW, Yagiu M (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. Antonie Van Leeuwenhoek 44: 59-77.

Young TW (1981). The Genetic Manipulation of Killer Character Into Brewing Yeast. Journal of the Institute of Brewing 87: 292-295.

Zhu YS, Kane J, Zhang XY, Zhang M, Tipper DJ (1993). Role of the gamma component of preprotoxin in expression of the yeast K1 killer phenotype. Yeast 9: 251-266.

Zivanovic Y, Wincker P, Vacherie B, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H (2005). Complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA from *Kluyveromyces lactis*. FEMS Yeast Research 5(4-5): 315-22.

9. Mellékletek

	gének mérete (bp)			
faj	**cob**	**cox1**	**nad5**	**rnl**
C. albicans SC5314	2809 +	6153 +	1659 -	3131 +
C. dubliniensis CD36	1481 +	6186 +	1656 -	3113 +
C. orthopsilosis MCO456	2348 +	1826 +	1665 -	2799 -
C. orthopsilosis MCO471	2348 +	3145 +	1665 -	2843 -
C. metapsilosis MCO488	2579 +	1596 -	1668 -	2571 -
C. metapsilosis PL48	2579 +	1596 -	1668-	2571 -
C. parapsilosis CLIB214	3783 +	7386 +	1668 -	3211 +
C. parapsilosis SR23	3785 +	7386 +	1668 -	3211 +
C. neerlandica NRRL Y-27057	2993 +	4031 +	2865 +	3066 +
C. viswanathii CBS4024	3685 +	4477 +	2029 +	3208 +
C. maltosa CBS5611	3388 +	4334 +	1656 -	4250 +
C. tropicalis MYA-3404	1194 -	4764 +	1683-	2480 -
C. sojae CBS7871	1164 -	5059 +	1698 -	2638 -
Lodderomyces elongisporus CBS2605	1158 -	1593 -	1677 -	2644 -
Debaryomyces hansenii CBS767	5602 +	5319 +	1779 -	2362 -

1. melléklet: *Candida albicans* kládba tartozó törzsek cob, cox1, nad5 és rnl génjeinek mérete és intronok jelenléte (+: van intron; -: nincs intron)

Faj	nad5 intronok
C. albicans SC5314	-
C. dubliniensis CD36	-
C. orthopsilosis MCO456	-
C. orthopsilosis MCO471	-
C. metapsilosis MCO488	-
C. metapsilosis PL48	-
C. parapsilosis CLIB214	-
C. parapsilosis SR23	-
C. neerlandica NRRL Y-27057	I^{0} (LAGLI2, IENR1)
C. viswanathii CBS4024	I^{+1} (nincs motívum)
C. maltosa CBS5611	-
C. tropicalis MYA-3404	-
C. sojae CBS7871	-
L. elongisporus CBS2605	-
D. hansenii CBS767	-

faj	rnl intronok
C. albicans SC5314	I1 (nincs motívum) és I2 (nincs motívum)
C. dubliniensis CD36	I1 (nincs motívum) és I2 (nincs motívum)
C. orthopsilosis MCO456	-
C. orthopsilosis MCO471	-
C. metapsilosis MCO488	-
C. metapsilosis PL48	-
C. parapsilosis CLIB214	I1 (nincs motívum) és I2 (nincs ORF)
C. parapsilosis SR23	I1 (nincs motívum) és I2 (nincs ORF)
C. neerlandica NRRL Y-27057	I (nincs ORF)
C. viswanathii CBS4024	I1 (nincs motívum) és I2 (nincs motívum)
C. maltosa CBS5611	I1 (nincs motívum) és I2 (nincs ORF)
C. tropicalis MYA-3404	-
C. sojae CBS7871	-
L. elongisporus CBS2605	-
D. hansenii CBS767	-

2. melléklet: *Candida albicans* kládba tartozó törzsek nad5 és rnl génjeiben található intronok. Felső indexben az intront követő exon reading frame-je (0, +1, +2), zárójelben az intronban található motívum. Rövidítések a 2., 3., 4. mellékletben: LAGLI1, LAGLI2: LAGLI-DADG endonukleáz család (I. típusú intron), GIY-YIG: GIY-YIG katalitikus domén (I típusú intron), HNHc: HNH endonukleáz család, GIIM: II típusú intron, maturáz-specifikus domén, RT-G2: reverz transzkriptáz II. típusú intron eredettel, RT-nLTR like: non-LTR (long terminal repeat) retrotranszpozíció és non-LTR retrovirus reverz transzkriptáz II. típusú eredettel; intron maturáz 2: II. típusú intron maturáz, IENR1: intron kódolt nukleáz repeat motívummal

	cob intronok					
faj	1. pozíció (131. as)	2. pozíció (143. as)	3. pozíció (164. as)	4. pozíció (165. as)	5. pozíció (228. as)	6. pozíció (252. as)
C. albicans SC5314	$I1^{0}$ (GIY-YIG)	$I2^{+1}$ (nincs ORF)	0	0	0	0
C. dubliniensis CD36	0	I^{+2} (nincs motívum)	0	0	0	0
C. orthopsilosis MCO456	0	I^{+2} (LAGLI2)	0	0	0	0
C. orthopsilosis MCO471	0	I^{+2} (LAGLI2)	0	0	0	0
C. metapsilosis MCO488	I^{+2} (GIY-YIG)	0	0	0	0	0
C. metapsilosis PL48	I^{+2} (GIY-YIG)	0	0	0	0	0
C. parapsilosis CLIB214	$I1^{+2}$ (GIY-YIG)	$I2^{0}$ (LAGLI2)	0	0	0	0
C. parapsilosis SR23	$I1^{+2}$ (GIY-YIG)	$I2^{+2}$ (LAGLI2)	0	0	0	0
C. neerlandica NRRL Y-27057	$I1^{+1}$ (nincs motívum)	0	$I2^{0}$ (nincs motívum)	0	0	$I3^{+2}$ (LAGLI1)
C. viswanathii CBS4024	0	0	0	0	I^{+1} (RT-G2)	0
C. maltosa CBS5611	$I1^{+2}$ (GIY-YIG)	0	0	$I2^{+1}$ (nincs motívum)	0	0
C. tropicalis MYA-3404	-	-	-	-	-	-
C. sojae CBS7871	-	-	-	-	-	-
L. elongisporus CBS2605	-	-	-	-	-	-
D. hansenii CBS767	$I1^{0}$ (GIY-YIG)	$I2^{+2}$ (LAGLI2)	$I3^{+1}$ (LAGLI1)	0	0	0

3. melléklet: *Candida albicans* kládba tartozó törzsek cob génjében található intronok. Felső indexben az intront követő exon reading frame-je (0, +1, +2), zárójelben az intronban található motívum. További jelzéseket lásd a 2. mellékletben

	cox1 intronok										
faj	1. pozíció (81. as)	2. pozíció (131. as)	3. pozíció (237. as)	4. pozíció (239. as)	5. pozíció (242. as)	6. pozíció (246. as)	7. pozíció (291. as)	8. pozíció (355. as)	9. pozíció (371. as)	10. pozíció (373. as)	11. pozíció (381. as)
C. albicans SC5314	0	$I1^{+2}$ (LAGLI1)	0	$I2^{+1}$ (LAGLI1)	0	0	0	0	$I3^{0}$ (LAGLI1)	0	0
C. dubliniensis CD36	0	$I1^{0}$ (LAGLI1)	0	$I2^{+2}$ (LAGLI1)	0	0	0	0	$I3^{0}$ (LAGLI1)	0	0
C. orthopsilosis MCO456	0	0	0	0	0	0	0	I^{+2} (nincs ORF)	0	0	0
C. orthopsilosis MCO471	0	0	0	0	0	0	$I1^{0}$ (LAGLI1)	$I2^{+1}$ (nincs ORF)	0	0	0
C. metapsilosis MCO488	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. metapsilosis PL48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. parapsilosis CLIB214	$I1^{0}$ (RT-G2, RT-nLTR like, GIIM, HNHc)	0	$I2^{0}$ (LAGLI1)	0	0	0	$I3^{0}$ (LAGLI1)	0	0	0	0
C. parapsilosis SR23	$I1^{0}$ (RT-G2, RT-nLTR like, GIIM, HNHc)	0	$I2^{0}$ (LAGLI1)	0	0	0	$I3^{0}$ (LAGLI1)	0	0	0	0
C. neerlandica NRRL Y-27057	0	$I1^{+1}$ (LAGLI1)	0	0	$I2^{+1}$ (nincs ORF)	$I3^{+2}$ (LAGLI1)	0	0	0	0	0
C. viswanathii CBS4024	0	$I1^{0}$ (LAGLI1)	0	0	0	$I2^{+2}$ (nincs motívum)	$I3^{+1}$ (LAGLI1)	0	0	0	0
C. maltosa CBS5611	0	0	0	0	$I1^{+1}$ (LAGLI1)	0	0	0	0	$I2^{+2}$ (nincs ORF)	0
C. tropicalis MYA-3404	0	I1 (LAGLI1)	0	0	I2 (LAGLI1)	0	I3 (LAGLI1)	0	0	0	0
C. sojae CBS7871	0	0	0	0	$I1^{+1}$ (LAGLI1)	0	0	0	0	0	$I2^{+1}$ (RT-G2, intron maturase 2, HNHc)
L. elongisporus CBS2605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. hansenii CBS767	0	$I1^{+2}$ (LAGLI1)	0	0	$I2^{0}$ (LAGLI1)	0	0	0	$I3^{0}$ (LAGLI1)	0	0

4. melléklet: *Candida albicans* kládba tartozó törzsek cox1 génjében található intronok. Felső indexben az intront követő exon reading frame-je (0, +1, +2), zárójelben az intronban található motívum. További jelzéseket lásd a 2. mellékletben

Intronok	upstream exon utolsó nukleotidja	intron 5' végi szekvencia	intron 3' végi szekvencia
Group II		**GUGCG…**	**…AY**
*Cv*COB.I1		TTGCGCCG…	…TAGTTCAAT
$Cp_{CLIB214}$CI.I1		TTACGACG…	…ATCTCTAGT
Cp_{SR23}CI.I1		TTACGACG…	…ATCTCTAGT
*Cs*CI.I1		GGTGCGCC…	…CTATTTTCA
Group I	**…T**		**…G**
*Cn*N5.I1	…T		…G
*Cv*N5.I1	…T		…G
*Cma*LSU.I1	…T		...G
*Cma*LSU.I2	…T		...G
*Cn*LSU.I1	…T		...G
$Cp_{CLIB214,\ SR23}$LSU.I1	…T		...G
$Cp_{CLIB214,\ SR23}$LSU.I2	…T		...G
*Ca*COB.I1	...T		...G
*Ca*COB.I2	...T		...G
*Cd*COB.I1	...T		...G
*Dh*COB.I1	...T		...G
*Dh*COB.I2	...T		...G
*Dh*COB.I3	...T		...G
*Cma*COB.I1	...T		...G
*Cma*COB.I2	...T		...G
$Cme_{MCO488,\ PL48}$COB.I1	...T		...G
*Cn*COB.I1	...T		...G
*Cn*COB.I2	...T		...G
*Cn*COB.I3	...T		...G
$Co_{MCO456,\ MCO471}$COB.I1	...T		...G
$Cp_{CLIB214}$COB.I1	...T		...G
Cp_{SR23}COB.I1	...T		...G
$Cp_{CLIB214,\ SR23}$COB.I2	...T		...G
*Ca*CI.I1	...T		...T
*Ca*CI.I2	...T		...G
*Ca*CI.I3	...T		...G
*Cd*CI.I1	...T		...T
*Cd*CI.I2	...T		...G
*Cd*CI.I3	...T		...G
*Dh*CI.I1	...C		...A
*Dh*CI.I2	...T		...G
*Dh*CI.I3	...T		...G
*Cma*CI.I1	...T		...G
*Cma*CI.I2	...T		...G
*Cn*CI.I1	...T		...G
*Cn*CI.I2	...T		...G
*Cn*CI.I3	...T		...G
$Co_{MCO471,\ MCO456}$CI.I1	...T		...G
Co_{MCO471}CI.I2	...T		...G
$Cp_{CLIB214,\ SR23}$CI.I2	...T		...G
$Cp_{CLIB214,\ SR23}$CI.I3	...T		...G
*Cs*CI.I1	...T		...G
*Ct*CI.I1	...T		...T
*Ct*CI.I2	...T		...G
*Ct*CI.I3	...T		...G
*Cv*CI.I1	...T		...G
*Cv*CI.I2	...T		...G
*Cv*CI.I3	...T		...G

5. melléklet: *Candida albicans* kládba tartozó törzsek mitokondriális intronjainak jellegzetes szekvencia adatai. (Y= C vagy T)