DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

BIOLÓGIA DOKTORI PROGRAM

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS ELLEN HATÁSOS KILLER TOXINT TERMELŐ ILLETVE NEM TERMELŐ *FILOBASIDIUM CAPSULIGENUM* TÖRZSEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA, TOXINJUK JELLEMZÉSE

KÉSZÍTETTE: KESZTHELYI ANDREA

TÉMAVEZETŐ: DR. KUCSERA JUDIT

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2008

Tartalomjegyzék

Rövidítések **4**
Törzsgyűjtemény kódok **5**

1. Bevezetés **6**

2. Irodalmi áttekintés **8**
2.1. *Basidiomycota* élesztők 8
2.1.1. *Basidiomycota* élesztők taxonómiája 8
2.1.2. *Basidiomycota* élesztők felhasználási lehetőségei 10
2.1.3. *Basidiomycota* élesztők klinikai szerepe 10
2.1.4. Filogenetikai kapcsolataik meghatározására alkalmazott molekuláris módszerek 10
2.2. *Tremellomycetes* 14
2.2.1. *Tremellales* 15
2.2.1.1. Cryptococcus neoformans 15
2.2.2. *Filobasidiales* 18
2.2.2.1. Filobasidium capsuligenum 18
2.3. Killer toxinok 19
2.3.1. Általános jellemzés 19
2.3.2. Előfordulás, ökológiai szerep 20
2.3.3. Genetikai háttér 21
2.3.4. Toxin-érés, gazdasejt gének szerepe 23
2.3.5. Hatásmechanizmus 25
2.3.5.1. Sejtek felismerése, toxin aktív komponensének transzportja a célmolekulákhoz 25
2.3.5.2. Killer toxinok hatásmódja 26
2.3.6. Immunitás-faktor, rezisztens törzsek 27
2.3.7. Killer toxinok felhasználási lehetőségei 28
2.3.7.1. Taxonómiai felhasználás 28
2.3.7.2. Ipari, gyógyászati felhasználás 29

3. Anyagok és módszerek **32**
3.1. Felhasznált törzsek 32
3.1.1. *Filobasidium capsuligenum* törzsek 32
3.1.2. *Cryptococcus neoformans* törzsek 32
3.1.3. További törzsek 32
3.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok 33
3.2.1. Törzsek növesztésére és fenntartására használt táptalajok, tápoldatok 33
3.2.2. Toxintermelés körülményeinek optimalizálására használt tápoldatok 33
3.2.3. Párosodási típus meghatározásához használt táptalajok 34
3.2.4. *Cryptococcus* törzsek izolálásához használt táptalajok 34
3.3. Egyéb felhasznált oldatok, reagensek 35
3.4. Fenotípus-vizsgálatok 37
3.4.1. Killer fenotípus meghatározása 37

3.4.2. Killer toxin fermentálása 37
3.4.3. Párosodási típus meghatározása 37
3.4.4. Izolált *Cryptococcus*-ok azonosítására irányuló kísérletek 37
3.5. Genotípus-vizsgálatok 39
3.5.1. Nukleinsav-izolálás (Leach *et al.*, 1986) 39
3.5.2. Nukleinsavak analízise 39
3.5.2.1. PCR-reakció ITS és D1/D2 szekvenci-analízishez 39
3.5.2.2. DNS-szekvenálás 40
3.5.3. RAPD-analízis, PCR-fingerprinting 40
3.5.4. mtDNS RFLP 41
3.6. Filogenetikai analízis 42
3.6.1. DNS-szekvenciaadatok értékelése 42
3.6.2. Fenogram készítése PCR-fingerprinting, RAPD- ill. mtDNS RFLP-adatok alapján 42
3.7. Toxinok biokémiai természetének meghatározása 42
3.7.1. Toxintartalmú fermentlé előállítása 42
3.7.2. Hőmérséklet-optimum meghatározása 42
3.7.3. pH-optimum meghatározása 42
3.7.4. Proteázkezelés 43
3.8. Toxin azonosítása, tisztítása 43
3.8.1. Toxin méretének meghatározása 43
3.8.2. SDS-gélelektroforézis 43
3.8.3. UV-mutagenezis 44
3.8.4. Toxin kötődése *C. neoformans* sejtekhez 44
3.8.5. Toxin tisztítása *C. neoformans* ill. *S. cerevisiae* sejtekkel 44
3.8.6. Affinitáskromatográfia 45
3.9. Toxin hatásmechanizmusára irányuló vizsgálatok 46
3.9.1. FITC-festés 46
3.9.2. Sejtfali receptorhely azonosítása 46
3.9.3. Lézer szkenning citometria 46

4. Eredmények ismertetése és értékelése 47
4.1. Termelő törzsek felderítése, killer-szenzitív kapcsolatok tisztázása 47
4.1.1. Antikriptokokkális toxin termelő törzsek felderítése 47
4.1.2. *F. capsuligenum* törzsek egymásra gyakorolt hatása (keresztreakciók) 49
4.1.3. Következtetések 50
4.2. Killer és non-killer fenotípusú *F. capsuligenum* törzsek jellemzése, filogenetikai kapcsolataik elemzése 51
4.2.1. Mating-típusuk meghatározása 51
4.2.2. Extrakromoszómális elemek jelenlétének vizsgálata 53
4.2.3. rRNS-eket kódoló DNS-szekvenciák összehasonlítása 54
4.2.4. RADP-analízis 56
4.2.5. mDNS-RFLP analízis 58
4.2.6. Következtetések 60
4.3. Termelő törzsek toxinjainak jellemzése, összehasonlítása 61
4.3.1. Hatásspektrum-vizsgálat 61
4.3.1.1. Hatásuk C. neoformans törzsekre 61

4.3.1.2. Hatásuk egyéb gombatörzsekre 63
4.3.2. Toxinok biokémiai természetének meghatározása 64
4.3.2.1. Termeltetés optimális körülményeinek meghatározása 64
4.3.2.2. Toxinok biokémiai tulajdonságainak vizsgálata 65
4.3.2.2.1. Toxinok aktivitásának hőmérséklet- és pH-optimuma 65
4.3.2.2.2. Proteázkezelés hatása toxinok aktivitásra 67
4.3.3. Következtetések 68
4.4. IFM 40078 törzs által termelt FC-1 toxin jellemzése 70
4.4.1. FC-1 toxin hatásspektruma 70
4.4.1.1. Cryptococcus törzsek izolálása környezeti és klinikai mintákból 70
4.4.1.2. FC-1 toxin hatása Cryptococcus izolátumokra 71
4.4.1.3. FC-1 toxin hatása egyéb gombatörzsekre 71
4.4.1.4. Következtetések 71
4.4.2. FC-1 toxin azonosítása, részleges tisztítása 72
4.4.2.1. Méretének becslése 72
4.4.2.2. Különböző tápoldatban növesztett IFM 40078 extracelluláris fehérje-mintázata 73
4.4.2.3. Termelő és nem termelő törzsek extracelluláris fehérje-mintázatának összehasonlítása 75
4.4.2.3.1. Nem termelő mutáns törzsek előállítása 75
4.4.2.3.2. Mutáns törzsek, nem termelő VKM 1513 és termelő IFM40078 extracelluláris fehérjemintázatainak összehasonlítása 75
4.4.2.4. FC-1 toxin tisztítása célsejtekhez való kötődését kihasználva 77
4.4.2.4.1. Toxin kötődése célsejtekhez 77
4.4.2.4.2. Tisztítás célsejtek felhasználásával 78
4.4.2.5. Tisztítás affinitáskromatográfiával 79
4.4.2.6. Következtetések 81
4.4.3. FC-1 toxin hatásmódja 82
4.4.3.1. Sejtfali receptorhely azonosítása 82
4.4.3.2. Növekedésgátlás vizsgálata (citocidikus vagy citosztatikus hatás) 83
4.4.3.3. Toxin hatása az érzékeny sejtek sejtciklusára 85
4.4.4. Toxinok hatása az érzékeny sejtek protoplasztjaira 86
4.4.5. Következtetések 87

5. Összefoglalás 88

6. Summary 93

7. Köszönetnyilvánítás 98

8. Irodalmi hivatkozások 99

9. Függelék 109
9.1. Toxintermelésre, ill. FC-1 toxinnal szembeni érzékenységre vizsgált élesztő törzsek 109
9.2. Általunk izolált *Cryptococcus* törzsek 114
9.3. FC-1 toxinnal szembeni érzékenységre vizsgált fonalasgombák 116

Rövidítések

C	-Citozin
CFU	-Colony Forming Unit – Telepképző egység
D1/D2	-28S rRNS gén variábilis régiója
DBB	-Diazonium Blue B
DNS	-Dezoxiribonukleinsav
EDTA	-Ethylenediaminetetraacetic acid – Etiléndiamin-tetraecetsav
ER	-Endoplazmatikus reticulum
FITC	-Fluoreszcein-izotiocianát
G	-Guanin
GalXM	-Galaktoxilomannán
GXM	-Glükuronoxilomannán
ITS	-Internal Transcribed Spacer
kbp	-Kilobázispár
L-DOPA	- L-3,4-dihidroxiphenilalanine – L-3,4-dihidroxifenilalanin
mtDNS	-mitokondriális DNS
ORF	-Open Reading Frame – Nyitott leolvasási keret
PCR	-Polymerase Chain Reaction – Polimeráz láncreakció
PFGE	-Pulsed Field Gel Electrophoresis – Pulzáltatott mezejű gélelektroforézis
PVDF	-Polivinilidén fluorid
RAPD	-Random Amplified Polymorphic DNA – Random amplifikált polimorfikus DNS
rDNS	-Riboszómális RNS-t kódoló DNS szakasz
RFLP	-Restriction Fragment Length Polymorphism – Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
RNS	-Ribonukleinsav
rRNS	-Riboszómális RNS
VNTR	-Variable Number of Tandem Repeats
SDS	-Sodium-dodecylsulfate – Nátrium-dodecilszulfát
Tris	-Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
UV	-Ultraviolet/Ultraibolya sugárzás

Törzsgyűjtemény kódok

ATCC -American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

CBS **-**Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia

IFM **-**Culture Collection of the Research Centre for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japán

IFO -Institute for Fermentation, Osaka, Japán

JCM **-**Japan Collection of Microorganisms, Riken, Saitama, Japán

NCAIM **-**National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms Budapest, Magyarország

VKM **-**All-Russian Collection of Microorganisms, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Oroszország

CCY -Culture Collection of Yeasts, Institute of Chemistry, Pozsony, Szlovákia

FBUA **-**Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry, Budapest, Magyarország

SZMC **-**Szeged Microbial Collection, University of Szeged, Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

A természetben a különböző életterekért, tápanyagokért folytatott kompetíció során a különböző organizmusok eltérő mechanizmusokat fejlesztettek ki sikeres terjeszkedésükhöz és fennmaradásukhoz. Ezek közé tartoznak az antagonista kölcsönhatások, melyek során az adott organizmus gátolja versenytársai növekedését. Ilyen folyamatok az élővilág minden szintjén megtalálhatók a prokariótáktól a magasabb rendű élőlényekig. Ez a növekedésgátlás lehet általános hatású, vagy specifikus, azaz csak bizonyos törzsekre ható. A specifikus gátlást okozó metabolitok közé tartoznak a gombák által kiválasztott, általában csak a termelő törzzsel rokon mikroorganizmusokra ható killer toxinok. A killer toxinokat mintegy negyven évvel ezelőtt írták le *Saccharomyces cerevisiae*-nél, és azóta egyre több törzsről derül ki, hogy killer-fenotípussal rendelkezik. A killer toxinokról szerzett információk pedig egyre szélesebb körben segítik a kutatókat a különböző biológiai folyamatok megértésében. Mindemellett ezen antifungális szerek használatában számos ipari és mezőgazdasági felhasználási lehetőség rejlik, melyek közül néhány már a kísérleti szakaszt túllépve tényleges hasznot hajt. Klinikai felhasználásra olyan killer toxinokat, ill. ezek alapján kifejlesztett antifungális szereket tesztelnek, melyek patogén élesztőket (*Candida, Trichosporon* fajokat, *Cryptococcus neoformans*-t) képesek növekedésükben gátolni. Az AIDS-betegség, ill. az egyéb immunrendszert károsító tényezők (szervtranszplantáció, szteroidkezelés, diabétesz, limfóma, leukémia, Hodgkin-kór) terjedésével ezeknek a patogének egyre nagyobb a klinikai jelentősége.

Munkánk során mi is ilyen, elsősorban *C. neoformans* ellen hatásos toxint termelő törzseket kerestünk. A *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzse igen hatékony antikriptokokkális toxint termel. Mivel ismert, hogy a killer-fenotípus törzsre, nem pedig fajra jellemző tulajdonság, további *F. capsuligenum* izolátumokat vizsgáltunk toxintermelésükre nézve. Megvizsgáltuk, hogy a killer-fenotípusú és a nem termelő törzsek más tulajdonságaikban mennyire térnek el, ill. megpróbáltuk tisztázni filogenetikai kapcsolataikat, különböző faj ill. faj alatti kategóriák elkülönítésére alkalmas molekuláris módszerekkel. Ezek között szerepelt különböző variábilis rDNS-régiók összehasonlítása, PCR-fingerprinting, RAPD-analízis ill. mtDNS-RFLP.

Amellett, hogy egy faj nem minden törzse termel toxint, ismert az is, hogy a termelő törzsek nem mindig ugyanazt a toxint termelik ill. esetenként egy törzs többféle toxint is szekretálhat. Ezért munkánk során célunk volt a killer-fenotípussal rendelkező törzsek toxinjainak összehasonlítása is. Ehhez hatásspektrumuk összevetése mellett célul tűztük ki genetikai hátterük, ill. különböző biokémiai tulajdonságaik összehasonlítását is. Emellett kísérletet tettünk a *F. capsuligenum* IFM 40078 törzs FC-1 toxinjának azonosítására és részleges tisztítására. Az ismert toxinok igen eltérő hatásmechanizmussal rendelkeznek, károsíthatják a membránt, megállíthatják a sejtciklus folyamatát, gátolhatják a sejtfal szintézisét, stb. Általában azonban mind rendelkeznek sejtfali- ill. membránreceptorral, melyek szükségesek a specificitás biztosításához. Patogén élesztők ellen hatékony toxinok esetében ezek pontosabb megismerése fontos információkat nyújthat különböző antifungális szerek kifejlesztéséhez. Mindezért munkánk során célunk volt az FC-1 toxin hatásmechanizmusának megismerése és sejtfali receptorának felderítése is.

Célkitűzéseink tehát a következők voltak:

- Antikriptokokkális toxint termelő törzsek felderítése
- *F. capsuligenum* törzsek killer fenotípus-eloszlásának vizsgálata, killer-szenzitív kapcsolatok tisztázása.
- *F. capsuligenum* termelő és nem termelő törzseinek összehasonlítása, filogenetikai kapcsolataik elemzése
- Termelő törzsek által szekretált toxinok összehasonlítása, hatásspektrumuk és biokémiai jellemzőinek leírása
- Az IFM 40078 törzs FC-1 toxinjának pontosabb megismerése, azonosítása tisztítása
- Az FC-1 toxin hatásmechanizmusának feltárása, sejtfali receptorának azonosítása

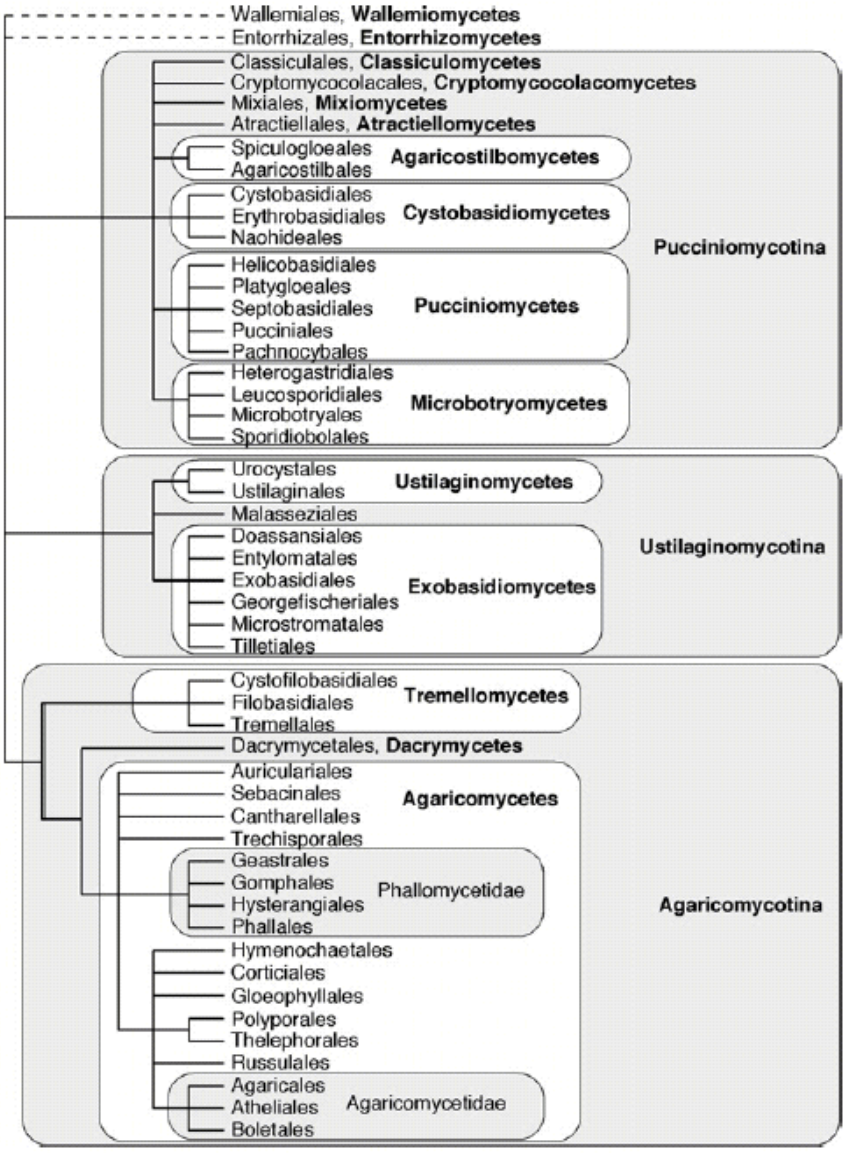
2. Irodalmi áttekintés

2.1. *Basidiomycota* élesztők

Számos *Basidiomycota* gomba életciklusában megfigyelhetünk élesztő fázist, mely során az egyes sejtek sarjadzással osztódnak. Ezeket azonban nem nevezzük élesztőknek. Ebbe a kategóriába azokat a fajokat soroljuk, melyeket élesztőkként írtak le, és csak később bizonyosodott be róluk, hogy szexuális ciklusuk során *Basidiomycota* jellegekkel rendelkeznek, mint pl. a bazídiumok ill. bazidiospórák fejlesztése, csatképzés, dolipórusos szeptum, lamináris sejtfalszerkezet – DBB festődés.

2.1.1. *Basidiomycota* élesztők taxonómiája

A Whittaker-féle rendszerben még *Basidiomycetes*-ként szereplő taxonómiai egységet Moore 1980-ban validálta a Bold által már 1957-ben használt (Bold HC, 1957) *Basidiomycota* néven (Moore, 1980). A *Basidiomycota* törzset az *Ascomycota* törzzsel együtt - a dikariotikus hifák feltételezett szünapomorfológiája alapján (Tehler, 1988) - egy, a közelmúltban megjelent, számos, különböző gombataxonómiával foglalkozó szervezet nemzetközi összefogásával készült osztályozás a *Fungi* birodalmon (kingdomon) belül a *Dikarya* albirodalomba (subkingdom) sorolta. Az *International Code of Botanical Nomenclature* (McNeil *et al.*, 2006) alapján módosított Linné-féle rendszert követő felosztás hét taxonómiai szintet használ: birodalom, albirodalom, rend (-*ales* végződés), alosztály (-*mycetidae*), osztály (-*mycetes*), altörzs (-*mycotina*) és törzs (-*mycota*). A *Basidiomycota* törzsön belül három altörzset különítenek el: *Pucciniomycotina*, *Ustilagomycotina* és *Agaricomycotina*, melyek megfelelnek a régebbi felosztás szerinti *Urediniomycetes*, *Ustilaginomycetes* ill. *Basidiomycetes/Hymenomycetes* osztályoknak. A három altörzs elkülöníthető a sejtek szénhidrát-összetétele, szeptumuk szerkezete ill. rRNS szekvencia adatok alapján (Szécsi *et al.*, 2003). *Wallemiomycetes* és *Entorrhizomycetes* osztályok besorolása még bizonytalan (2-1. ábra) (Hibbett *et al.*, 2007; Matheny *et al.*, 2007). A dolgozat ezt a taxonómiai felosztást követi, de zárójelben a régebbi elnevezéseket is feltüntetjük.



2-1. ábra: *Basidiomycota* gombák filogenetikája, és osztályozása. A szaggatott vonallal jelzett taxonok helye bizonytalan (Hibbett *et al.*, 2007).

Basidiomycota élesztőket elsősorban a *Pucciniomycotina* (*Urediniomycetes*) altörzs *Sporidiobolales* (*Sporidiales*) rendjében, ill. az *Agaricomycotina* (*Basidiomycetes*) altörzs *Tremellomycetes* osztályában találhatunk. A *Sporidiobolales* rend legismertebb képviselője a *Rhodosporidium toruloides* (haploid anamorfja: *Rhodotorula glutinis*)(Carlile *et al.*, 2004). A szintén ide tartozó *Leucosporidium* fajok anamorfjai a *Torulopsis* és a *Candida* nemzetségekbe tartoznak (Kevei *et al.*, 1999).

2.1.2. *Basidiomycota* élesztők felhasználási lehetőségei

Míg az *Ascomycota* élesztők igen széleskörű felhasználása ismert (sör-, bor-, kenyér- ill. különböző metabolitokat és/vagy enzimeket termelő élesztők), a *Basidiomycota* élesztőket ritkábban alkalmazzák ipari folyamatok során. Mindemellett néhány fajnál leírták különböző enzimek, például α-amilázok, proteázok termelését (De Mot & Verachtert, 1985; Yamamoto, 1991), ezek ipari felhasználása azonban még nem megoldott. Az ide tartozó fajok közül valószínűleg a karotenoid pigmentet (asztaxantint) termelő anamorf *Phaffia rhodozyma* ill. a teleomorf *Xanthophyllomyces dendrorhous* rendelkeznek a legnagyobb ipari jelentőséggel (Johnson, 2003).

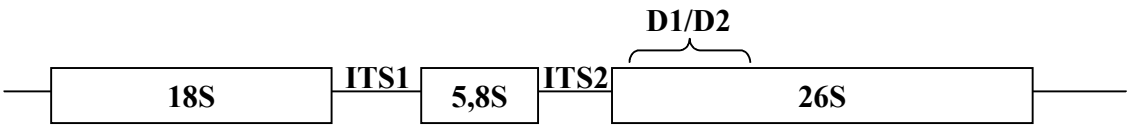
2.1.3. *Basidiomycota* élesztők klinikai szerepe

Ipari felhasználásuknál valószínűleg jóval nagyobb jelentősséggel bír néhány ide tartozó faj patogenitása. A *Cryptococcus neoformans* ill. a különböző *Trichosporon* fajok az AIDS betegség ill. egyéb immunrendszert károsító tényezők (szervtranszplantáció, szteroidkezelés, diabétesz, limfóma, leukémia vagy Hodgkin-kór) terjedésével egyre nagyobb arányban okoznak szisztémás mikózisokat.

2.1.4. Filogenetikai kapcsolataik meghatározására alkalmazott molekuláris módszerek

A morfológiai és fiziológiai tulajdonságok összehasonlítása (ballisztokonídium-, arthrokonídium- és pszeudomicélium-képzés, glükóz fermentáció, nitrát asszimiláció) mellett a *Basidiomycota* gombák taxonómiai osztályozására, filogenetikai kapcsolataik tisztázására irányuló kutatások során az elmúlt 20 év alatt egyre nagyobb szerephez jutottak a molekuláris technikák. Ezek nagy előnye, hogy aszexuális, konídiumokat nem képző fajok, sőt tiszta tenyészetben nem nevelhető kriptikus gombák is besorolhatók filogenetikai kapcsolataiknak megfelelően (Hawksworth, 2006). Molekuláris módszerek alkalmazásakor igen fontos a vizsgálni kívánt taxonómiai szintnek megfelelő technika kiválasztása. Elsősorban élesztők osztályozására alkalmas a gombák nukleáris DNS bázisösszetételének, G:C (Guanin:Citozin) tartalmának meghatározása, mely a nagyobb taxonómiai egységek (*Ascomycota-Basidiomycota*) elkülönítése mellett alkalmas lehet fajok meghatározására is. 8%-nál kisebb különbség esetén valószínűsíthető két izolátum

egy fajba tartozása (Guarro *et al.*, 1999). A riboszómális RNS-eket kódoló DNS-szekvenciák különösen alkalmasak taxonómiai vizsgálatok céljára, mivel általánosan előfordulnak az élővilágban és megfelelő információtartalommal rendelkeznek. Tekintve, hogy különböző régióik eltérő evolúciós sebességgel változnak, a faj alatti taxonok elkülönítésétől az univerzális filogenetikai törzsfa megszerkesztéséig minden taxonómiai szint vizsgálatára alkalmasak (Kevei *et al.*, 1999). Míg a kódoló szakaszok többsége ill. a különböző transzkripciós faktorok szekvenciái magasabb taxonómiai szinteken, addig a jóval nagyobb variabilitású ITS (Internal Transcribed Spacer) szekvenciák, valamint a 26S riboszómális gén variábilis, D1/D2 régiója elsősorban nemzetségek, fajok, ill. faj alatti kategóriák vizsgálatakor alkalmazhatók. A 2-2. ábrán e variábilis régiók elrendeződése látható a rRNS génkluszterben.



2-2. ábra: Az rRNS kluszter variábilis régiói.

Napjainkban egyre nagyobb szerepet kapnak a magasabb taxonok kapcsolatainak vizsgálatakor az úgynevezett multigén-alapú filogenetikai kutatások. E módszer során egy vagy néhány kópiában előforduló, fehérjekódoló génekre írt PCR-primerek segítségével nyert szekvenciák kerülnek összehasonlításra. Ilyen gének a mitokondriális *atp6* gén, a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenázt kódoló *gaphd*, a polimeráz II két alegységét kódoló *rpb1* és *rpb2,* a β-tubulint ill. aktint kódoló gének, valamint a transzlációs elongációs faktor 1-α-t kódoló *tef-1* gén (Matheny *et al.*, 2007).

Mivel egyre több faj teljes genomi szekvenciája válik ismertté, a jövőben lehetőség nyílhat teljes genomok összehasonlításán alapuló taxonómiai vizsgálatok kifejlesztésére is, bár ehhez a szekvenálások felgyorsítása, és számos bioinformatikai probléma megoldása szükséges.

A fajok és faj alatti kategóriák filogenetikai kapcsolatainak meghatározására, törzsek tipizálására alkalmas molekuláris módszerek közé tartoznak a DNS-DNS hibridizáció, az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), DNS/PCR-

fingerprinting és RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction) analízisek. Közeli rokon törzsek hasonlósági fokának meghatározására alkalmas a DNS-DNS hibridizáció, mely során a DNS két szálának elválasztása után a heteroduplexek képződésének sebességét hasonlítják össze az egyes vonalak kettősszálúvá válásának kinetikájával. Általában a relatív hibridizációs érték 80%-a feletti értékek esetén sorolják egy, míg 20% alatt külön fajba a vizsgált törzseket (Vilgalys, 1998). Az RFLP-analízis a restrikciós enzimek azon tulajdonságát használja ki, hogy specifikus felismerőhellyel rendelkeznek a DNS-molekulán. Így a DNS-szekvencia eltérései hasítóhelyek eltűnését, ill. megjelenését okozhatják, különböző hasítási mintázatokat eredményezve. A módszer alkalmazható sejtmagi, ill. mitokondriális DNS-en (mtDNS) egyaránt (Gácser *et al.*, 2001). Mivel a mtDNS GC-tartalma kisebb, mint a sejtmagi DNS-é, ennek vizsgálatára GC-gazdag szekvenciafelismerő hellyel rendelkező restrikciós enzimek alkalmasak. Ezek a magi DNS-t apró fragmentekre hasítják, míg a mtDNS-t nagyobb, gélelektroforézissel elválasztható szakaszokra bontják (Kevei *et al.*, 1999). DNS-fingerprinting során az RFLP-vel kapott mintázathoz különböző rövid oligonukleotid próbákat hibridizálnak. Az alkalmazott próba lehet az M13 fág egy szakasza, miniszatellitek (VNTR - Variable Number of Tandem Repeats), melyek 9-10 bp ismétlődő, általában GC-gazdag szakaszok, ill. mikroszatellitek, melyekben 2-4 bázispárnyi szakasz ismétlődik. PCR-fingerprinting során ezeket a szakaszokat primerként használva az amplifikált fragmentek elválasztása után kapott mintázatokat elemzik (Sampaio *et al.*, 2001). Hasonlóan a PCR-fingerprinting technikához, RAPD-analízis során is rövid, kb. 10 bp hosszúságú primer segítségével amplifikálnak különböző mintázatokat adó fragmenteket. E primerek szekvenciái ismertek, de random nukleinsav-összetételűek (Williams *et al.*, 1990). Bizonyos esetekben, elsősorban patogén fajoknál alkalmas lehet a különböző vonalak elkülönítésére az izolátumok kariotipizálása, mely során a kromoszómákat pulzáltatott mezejű gél-elektroforézissel (PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis) választják el (Perfect *et al.*, 1993).

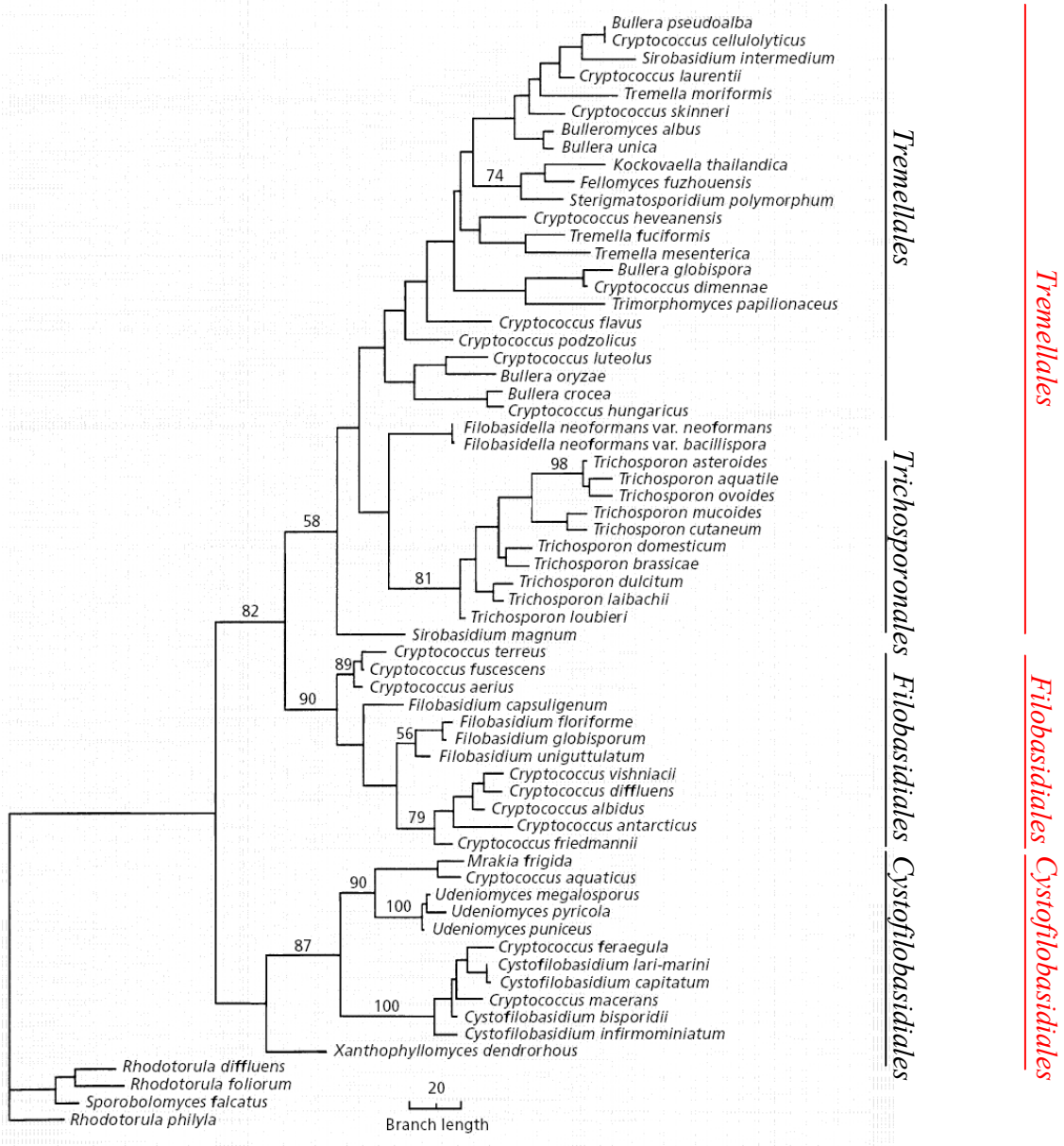
Néhány esetben proteinszekvenciák összehasonlításán alapuló módszereket is használnak taxonómiai tanulmányokhoz, ám ezek nagy anyag-, eszköz- és munkaigényük, valamint a fehérjék lassabb evulóciójából fakadó kisebb információ-tartalmuk miatt háttérbe szorulnak. Nagy a jelentőssége viszont az adott enzimek

különböző formáit felfedő izoenzim-analízisnek, mely során a sejtfeltárást követően, a fehérjéket gélelektroforézissel elválasztják, majd megfelelő enzimdetektálási módszerekkel láthatóvá teszik az adott funkciójú enzim különböző méretű formáit az eltérő törzsekben (Sampaio *et al.*, 2001).

Az antitest-antigén kölcsönhatásokat kihasználó szerológiai módszerek a gombataxonómiában ritkán használatosak, de például a *C. neoformans* varietasai jól elkülöníthtők vele. A tok polimerek eltérő felépítésén (2.2.1.1. fejezet) alapuló módszer során 8 (Ikeda *et al*., 1982), rutin felhasználáskor 5 (Kabasawa *et al.*, 1991) szérum faktor alkalmazásával *C. neoformans* törzsek 5 szerotípusra különíthetők el: A, B, C, D, és AD.

2.2. *Tremellomycetes*

Hibbett és munkatársai rendszere szerint a *Tremellomycetes* osztályba a *Tremellales*, *Filobasidiales* ill. *Cystofilobasidiales* rendek képviselői tartoznak (Hibbett *et al.*, 2007). Fell és munkatársai 2001-es rendszere (Fell *et al.*, 2001) külön taxonként kezelte *Trichosporonales* rendet, melyet Hibbett rendszere a *Tremellales* rendbe olvasztott (2-3. ábra).



2-3. ábra: A *Tremellomycetes* osztály rendszere. 18S ill. 25S rRNS szekvencia-analízisén alapuló fenogram (Fell *et al.*, 1999). A fekete vonal Fell, a piros vonal Hibbett rendszerét jelzi (Hibbett *et al.*, 2007).

2.2.1. *Tremellales*

A *Tremellales* rendbe tartozó fajok szeptumának záró anyaga szemcsés, parentöszómájuk folytonos (Szécsi *et al.*, 2003). Nagy jelentőségű humán patogén fajokat is magukba foglaló nemzetségek (*Cryptococcus*, *Trichosporon*) tartoznak ide. A *Trichosporon* fajok arthrokonídiumokat és blasztokonídiumokat képeznek, számos szénhidrátot képesek asszimilálni és ureáz-pozitívak. Általában felszíni fertőzést, az ún. fehér piedra betegséget okozzák, de szisztémás fertőzés esetén különböző belső szervekre terjedve súlyos megbetegedést is előidézhetnek, főként hematológiai alapbetegséggel rendelkező egyedeken. A legnagyobb patológiai jelentősségű fajok a *T. asahii, T. inkin* és a *T. mucoides.* Emellett bár ritkábban, de a *T. cutaneum* (*syn. T. beigelii*), *T. ovoides* és a *T. asteroides* fajok is előfordulnak klinikai mintákban.

Az egyre nagyobb klinikai jelentősségű *Cryptococcus neoformans*-ról az alábbiakban részletesebb leírást adunk.

2.2.1.1. Cryptococcus neoformans

A *Cryptococcus neoformans* a *Tremelalles* rendbe tartozó opportunista patogén bazídiumos gomba (Fell *et al.*, 2000). Bár a *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *C. luteus és C. uniguttulatus* is egyre több esetben okoz kriptokokkózist (Khawcharoenporn *et al.*, 2007), az esetek jelentős többségében a *C. neoformans* fertőz. Képes egészséges embereket is megbetegíteni, de elsősorban az immunrendszerükben valamilyen okból sérült egyéneket támadja. A fertőzést valószínűleg a levegőből izolálható kis méretű, vékony tokkal rendelkező sejtek belélegzése okozza, melyek képesek a tüdő alveolusokba jutni. A gomba virulenciájától ill. a gazda immunrendszerének állapotától függően különböző mértékben fertőzheti a tüdőt, valamint tovább terjedve támadhatja a bőrt, csontokat, prosztatát és egyéb belső szerveket. Leggyakoribb manifesztációja azonban a kriptokokkális meningitis, melynek tünetei fejfájás, mentális állapotváltozás és több hétig tartó láz (Meray, 2000). A pulmonáris kriptokokkózis sok esetben tünetmentes, de okozhat köhögést, mellkasi fájdalmakat, nyálkaképződést, súlyvesztést, lázat, valamint vérköpést. Megfelelően működő immunrendszerrel rendelkező egyéneknél riktán jelentkezik disszeminált fertőzés. *C. neoformans* virulenciája és patogenitása rágcsáló-modelleken tanulmányozható. Fertőződés intraperitoneális, intravénás és közvetlen

intracelebrális injekciók, valamint a természetes fertőződést legjobban megközelítő módon, intratracheális inokulációval idézhető elő (Mitchell & Perfect, 1995).

Cryptococcus neoformans a természetben talajban, galambürülékben (Emmos, 1955) valamint eukaliptuszfa törzsében (Ellis & Pfeiffer, 1992) fordul elő nagy gyakorisággal. Nem fermentál szénhidrátokat, azonban képes a glükóz, maltóz, szaharóz, galaktóz és az inozitol asszimilációjára. Ureáz-pozitív, toxint nem termel. Jellegzetes tulajdonsága, hogy a hidroxibenzol-származékokat barna vagy fekete pigmentté, melaninná alakítja, így L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanin) ill. napraforgós táptalajon telepei megbarnulnak (Kwon-Chung KJ, 1998a). Az 1-3 μm átmérőjű sejtjeit törzstől és környezeti faktoroktól függően különböző nagyságú tok borítja, mely a fehér vagy krémszínű telepeket nyálkássá teszi. *Cryptococcus neoformans* az egyetlen tokkal rendelkező eukarióta human pathogén. A tok anti-fagocitikus hatása és gyenge immunogenitása révén igen jelentős szerepet játszik a gomba virulenciájában. Két fő poliszaccharid alkotja: Glükuronoxilomannán (GXM) és Galaktoxilomannán (GalXM). GXM lineáris α(1,3)-mannán melynek minden harmadik mannóz egységén egy β(1,2)-glükuronsav oldallánc található, valamint az egyes triszacharid egységeken szerotípusonként eltérő számú és helyzetű β(1,2) vagy β(1,4) kapcsolt xilóz szubsztituens is megtalálható. E poliszacharid molekukák összetett, nagy molekula-súlyú szerkezetet alkotnak, melyek önálló összerendeződésük során egyre növekvő fonalas, szálas formát vesznek fel. GalMX elágazó szerkezetű, kisebb molekulasúlyú α(1,6)-galaktán. Pontos szerepe a tok felépítésében még nem tisztázott. A tok vastagságát számos környezeti tényező befolyásolja. Míg átlagos *in vitro* körülmények között mindössze 1-2 μm vastagságú, *in vivo* átmérője elérheti a 30-80 μm nagyságot is (McFadden et al., 2006).

A *C. neoformans* törzsek három varietasba csoportosíthatók: *C. neoformans var. grubii* - A szerotípusúak; *C. neoformans var. gattii* - B és C szerotípusúak; *C. neoformans var. neoformans* - D szerotípusúak. Ez a felosztás nem veszi figyelembe az AD szerotípust. Újabban AFLP vizsgálatok alapján (Boekhout *et al.*, 2001) két külön fajra osztják a *C. neoformans* törzseket, a *C. neoformans* (San Felice) Vuillemin-re (A, D és AD szerotípusok), valamint a *C. bacillisporus* Kwon-Chung-ra (B és C szerotípus). Ez utóbbi felosztás megfelel a korábban leírt teleomorf formáiknak is: *Filobasidiella*

neoformans ill. *F. bacillispora* (Kwon-Chung, 1998a). Miniszatellit ill. mikroszatellit-specifikus primerekkel végzett PCR fingerprintinggel valamint RAPD-analízissel, és az ITS-régiók alapján Katsu és munkatársai 8 molekuláris típust különítettek el: VNI és VNII = *C. neoformans var. grubii* (A), VNIII = *C. neoformans var. hybrid* (AD), VNIV = *C. neoformans var. neoformans* (D), VGI, VGII, VGIII, VGIV = *C. neoformans var. gattii* (B, C) (Katsu *et al.*, 2004).

A *C. neoformans* párosodását tekintve heterotallikus. Két párosodási típussal rendelkezik: **a** és α. Megfelelő körülmények között az ellentétes párosodási típusú élesztősejtek összeolvadnak dikariotikus hifát alkotva, melynek terminális sejtjében végbemegy a magfúzió és a meiózis. A folyamat végeredményeként négy haploid bazidiospóralánc jön létre (Kwon-Chung, 1976). A természetben az α mating-típus gyakrabban fordul elő (Wickes & Kwon-Chung, 2002). A *C. neoformans* egyes α mating-típusú sejtjei Nitrogénforrás hiányában képesek mating nélkül is pszeudohifaképzéssel bazídiumok és bazidiospórák létrehozására (Wickes *et al.*, 1996).

Mint minden gombafertőzés, a kriptokokkózis kezelése is nehézségekbe ütközik, mivel a különböző antifungális szerek többnyire jelentős mellékhatásokat okoznak, tekintve, hogy eukarióta célszervezetük sokban hasonlít az emberi sejtekre. Mindemellett további problémát jelent az egyre növekvő rezisztencia a különböző gyakran használt szerekkel, pl.: flukonazollal szemben. *Cryptococcus* okozta meningitisz esetén újabb akadályt jelent a vér-agy gát, melyen az alkalmazott antibiotikumnak át kell jutnia a megfelelő hatás eléréséhez. A kriptokokkózis kezelésére leggyakrabban amfotericin B-t, flucitozint, flukonazolt, vagy ezek kombinációit használják (Tintelnot *et al.*, 2001).

2.2.2. *Filobasidiales*

A *Filobasidiales* rendbe tartozó fajok általában hengeres bazídiummal rendelkeznek, melyekről a bazidiospórák passzívan terjednek. Bazidiokarp jelenlétét nem figyelték meg (Fell *et al.*, 2001). A *Filobasidiaceae* családba tartozó *Filobasidium capsuligenum*-ról a továbbiakban részletesebben szólunk.

2.2.2.1. Filobasidium capsuligenum

A *Filobasidium capsuligenum* (Rodrigues de Miranda) a *Filobasidiales* rendbe tartozó *Basidiomycota* élesztőgomba. Elsőként egy dél-afrikai sörfőzdéből izolálták, és *Torulopsis capsuligena* néven írták le 1961-ben (van der Walt & van Kerken, 1961). Később Fell *Leucosporidium capsuligenum*-ként azonosította (Fell *et al.*, 1969), végül Rodriges de Miranda újraosztályozása révén kapta a *Filobasidium capsuligenum* (Rodriges de Miranda) elnevezést (Rodrigues de Miranda, 1972). Később további törzseket izoláltak a világ különböző területeiről (Japánból, Nagy-Britanniából, Németországból, Olaszországból és Törökországból). Az izolátumok fermentációs közegből, talajból ill. gyümölcsökből, gyümölcslevekből származtak. Mindemellett kevés *F. capsuligenum* található a különböző törzsgyűjteményekben. Szemben a nemzetség más képviselőivel, a *F. capsuligenum* képes glükóz és maltóz fermentálásra. Sejtjei kerekdedek, ellipszoid vagy megnyúlt alakúak, alkothatnak pszeudomicéliumot ill. valódi micéliumot is. A sejteket borító tok a telepeket nyálkás felszínűvé teszi. Ivaros szaporodásuk heterotallikus, a párosodás után a micélium laterális vagy terminális holometabazídiumokat hoz létre (Kwon-Chung, 1998b).

Néhány törzs esetében különböző extracelluláris enzimek, amilázok (De Mot & Verachtert, 1985; De Mot & Verachtert, 1987) ill. proteázok (Yamamoto, 1991) termelését írták le, az IFM 40078 (CBS 4736, VKM Y-1439) törzsről pedig antikriptokokkális hatású killer toxin (FC-1) termelését mutatták ki (Golubev *et al.*, 1991). Az FC-1 toxin *C. neoformans* mellett más *Cryptococcus* fajok (*C. aerius, C. podzolicus, C. terreus)*, ill. az *Atractogloea, Fellomyces, Filobasidiella, Filobasidium, Sebacina* és *Tremella* nemzetségek egyes képviselői ellen is hatásosnak bizonyult (Golubev *et al.*, 1991; Golubev & Boekhout, 1995).

2.3. Killer toxinok

2.3.1. Általános jellemzés

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 sok esetben valamely extracelluláris termékükkel oly módon változtatják meg a környezetüket, hogy az kevésbé, vagy egyáltalán ne feleljen meg más organizmusok túléléséhez. Ezen antimikrobiális termékek lehetnek nem specifikusak, mint az élesztők szerves sav- vagy alkoholtermelése, mely a bakteriális növekedést általában gátolja. Ismertek azonban specifikusabb hatású élesztők által termelt extracelluláris termékek is. Ilyenek a régóta ismert fungicid vagy fungisztatikus hatású, fehérjetermészetű killer toxinok, ill. a nemrég leírt fungicid hatású extracelluláris glikolipidek (Golubev, 2006). Antimikrobiális hatású termékeket nem csak élesztők esetében írtak le, ezek a baktériumoktól a növényeken át az emlősökig mindenütt megtalálhatók (Nissen-Meyer & Nes, 1997; Selitrennikoff, 2001). Mikroorganizmusok esetében a baktériumok bakteriocinjein kívül (Joerger, 2003) ismertek üszöggombák (*Ustilago maydis*), paraméciumok (Preer, Jr. & Preer, 1967), és nyálkagombák (Mizutani *et al.*, 1990) rokon fajok ellen hatásos, toxikus termékei.

Bár az élesztők extracelluláris glikolipidjeit jóval korábban leírták (Spencer *et al.*, 1979), ezek antimikrobiális hatására csak napjainkban derült fény. Eddig *Cryptococcus humicola* (Puchkov *et al.*, 2002), *Pseudozyma flocculosa* (Cheng *et al.*, 2003), *P. fusiformata* (Golubev *et al.*, 2001) és *Sympodiomycopsis paphiopedili* (Golubev *et al.*, 2004) esetében írták le antibiotikus hatású glikolipidek termelését. Az ismert antifungális glikolipidek tartalmaznak cellobiózt (4-O-β-D-glükopiranozil-D-glükózt), mely glükozil kötéssel telített zsírsavakhoz (C16, C18) kapcsolódik, ezért cellobiolipideknek is nevezik őket. Hatásuk spektruma széleskörű; 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 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 & Belanger, 2002). Az extracelluláris glikolipidek szintézisét valószínűleg kromoszómális gének kontrollálják, mivel a termelő törzsekben sem dsRNS-vírusokat, sem DNS-plazmidokat nem mutattak ki (Golubev & Shabalin, 1994; Golubev *et al.*, 2001; Golubev *et al.*, 2004).

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 *et al.*, 2007).

A killer fenotípus jelenségét először *Saccharomyces cerevisiae* esetében írta le Bevan és Makower (1963). Ezt követően számos eltérő élesztőgomba-nemzetségben (*Saccharomyces, Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia,* stb.) mutatták ki a toxintermelés képességét. Napjainkra mintegy húsz nemzetségbe tartozó, több mint száz (Golubev, 2006), egyes becslések szerint 700 (Schmitt & Breinig, 2002) élesztőfajnál figyelték meg a jelenséget, és egyre több kutatás középpontjába kerül e toxinok molekuláris tulajdonságának, hatásmódjának, genetikai hátterének ill. a rájuk való érzékenységet meghatározó tényezőknek a vizsgálata.

A killer fenotípussal rendelkező termelő törzsek (mikocinogén törzsek) immunisak saját toxinjukra, ám más toxinokra viszont érzékenyek. Léteznek úgynevezett neutrális törzsek, melyek ugyan nem termelnek toxint, ám nem is érzékenyek rá (Golubev, 2006).

2.3.2. Előfordulás, ökológiai szerep

A toxintermelés előnyt jelenthet a hasonló biológiai niche-ért folytatott küzdelemben (Starmer *et al.*, 1987). Golubev és munkatársai a Prioksko-terrasny bioszféra-rezervátum (Oroszország) területén végzett felmérésük alapján megállapították, hogy killer fenotípusú élesztők jóval nagyobb arányban voltak megtalálhatók növényi eredetű mintákban, ahol az élesztő-koncentráció nagyobb, tehát a kompetíciónak jelentősebb szerep jut a túlélésben, mint a talajban, ahol az élesztők száma alacsonyabb. A felmérés alapján az is kiderült, hogy adott élőhelyről származó termelők toxinjára általában a nem

arról a területről származó élesztők mutattak érzékenységet. A talajból származó termelők toxinjai inkább a növényi minták élesztői ellen voltak hatásosak, és fordítva (Golubev & Golubeva, 2004). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a killer fenotípus szerepe valószínűleg a társulás összetételének fenntartása, az idegen, invazív törzsek elleni védelem. A killer toxin termelése azonban energiabefektetéssel is jár, ami csökkent növekedési képességet okoz, így a kompetícióban némi hátrányt jelenthet. Ez magyarázza, hogy a természetben lehetséges toxintermelő, és ugyanarra a toxinra érzékeny törzsek egy társulásban való előfordulása is (Pintar & Starmer, 2003). Azt, hogy a killer fenotípus nem ritka az élesztőgombák körében, egy Stumm és társai által végzett felmérés is mutatja. 9 különböző nemzetségből származó, 157 környezetből izolált élesztőtörzset vizsgálva kimutatták, hogy 17%-uk killer fenotípussal rendelkezett, 11%-uk pedig érzékeny volt valamely toxinra (Stumm *et al.*, 1977).

2.3.3. Genetikai háttér

A fenotípus genetikai háttere lehet citoplazmatikus: burkos dsRNS-vírus (VLP) által (Tipper & Bostian, 1984), ill. lineáris dsDNS-plazmid által kódolt (Gunge *et al.*, 1981; Hayman & Bolen, 1991) vagy kromoszómális (Kimura *et al.*, 1993). Az eddig leírt killer toxinok közt leggyakoribbak a vírus által kódoltak. Többek közt *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* (Schmitt & Neuhausen, 1994) és *Cystofilobasidium bisporidii* (Karamysheva *et al.*, 1991) esetében bizonyították, hogy az általuk termelt toxin víruseredetű. dsRNS-ek ill. plazmidok szerepének bizonyítéka lehet spontán non-killer törzsek megjelenése, ill. a fenotípus elvesztése hősokk, UV-besugárzás, etídium-bromid, cikloheximid, akridin-narancs, 5-fluorouracil vagy etil-metánszulfonát kezelés hatására. Ezek az eljárások mind a vírusok és plazmidok elvesztéséhez, így - ha a toxint ezek kódolják - a toxintermelő fenotípus megszűnéséhez vezetnek (Magliani *et al.*, 1997). A legjobban tanulmányozott toxintermelésért felelős vírusok a *S. cerevisiae* killer vírusai, melyek a K1, K2 ill. K28 toxinokat kódolják. Ezek a vírusok a *Totiviridae* családon belül a *Totivirus* csoportba sorolhatók. Mivel a növényi dsRNS-vírusokkal ellentétben horizontálisan nem, csak vertikálisan terjednek párosodás és/vagy heterokarion-képzés útján, ezeket a vírusokat VLP-knek, vírusszerű partikulumoknak (Virus Like Particles) is nevezik. A horizontális terjedés hiányának oka lehet, hogy magasabbrendű gombákban a

gyakori párosodás és hifafúzió feleslegessé tette e vírusok számára az extracelluláris transzmissziós utakat (Wickner, 1989). Mindemellett, mivel izolált és tisztított VLP-kel *in vitro* lehetséges *S. cerevisiae* sejtek transzfekciója, természetes közegben sem zárható ki VLP-infekció előfordulása (Schmitt & Neuhausen, 1994). A toxinokat ill. az immunitásért felelős faktort különböző kisebb szatellit (M1, M2 és M28) dsRNS-vírusok kódolják, melyek nagyobb helper (L-A) vírusoktól függenek, mivel ezek kódolják a replikációjukhoz szükséges kapszidfehérjéket, ill. RNS-polimerázokat. Így az M, ill. L vírusok bármelyikének elvesztése a toxintermelés elmaradásával ill. a toxinra való immunitás elvesztésével jár (Wickner *et al.*, 1995).

Az *Ustilago maydis* killer toxinjai (KP1, KP4 és KP6) szintén dsRNS-vírusokon kódoltak. Minden termelő törzs 3-7 különböző méretű dsRNS-szegmentet hordoz. Ezek három csoportba sorolhatók: H (heavy), M (medium) és L (light). A H szegment szükséges az M és L fenntartásához, mivel ez kódolja a vírus bepakolódásához szükséges kapszidfehérjéket. A killer toxin termelődéséért elsősorban az M szegment felelős (Koltin *et al.*, 1980). Az L szerepe nem teljesen tisztázott, a KP1 toxin esetében valószínűleg az immunitással hozható kapcsolatba.

Kluyveromyces lactis, *Pichia acaciae* és *Pichia inositovora* esetében megállapították, hogy a toxin termeléséért két, különböző méretű dsDNS-plazmid felelős (Ligon *et al.*, 1989; Bolen *et al.*, 1994; Schaffrath & Breunig, 2000). A *Kluyveromyces lactis* termelő törzsei 50-100 kópiát tartalmaznak a citoplazmatikusan öröklődő, lineáris plazmidokból, (pGKL1 (k1) és pGKL2 (k2)), a k1 8,874, míg a k2 13,447 bp méretű. A kisebb plazmid 4 ORF-je közül kettő (ORF2 és ORF4) a killer toxin alegységeinek prekurzorát kódolja, míg ORF3 az immunitás kialakításában vesz rész. Az ORF2 egy DNS-polimerázt kódol. A nagyobb plazmid 10 ORF-je a replikáció kontrolljában és a plazmidok fenntartásában játszik szerepet. A plazmidok fordított ismétlődéseket tartalmaznak, melyek 5' végei kovalens kötéssel terminális fehérjékhez kapcsolódnak (Stark *et al.*, 1990). Osztódáskor a plazmidok szegregációja valószínűleg véletlenszerű, gazda-gének által nem szabályozott. Ezt lehetővé teszi a magas kópiaszám, melynek visszaállítása a leánysejtekben a magi DNS megkettőződésétől független replikáció által biztosított (Magliani *et al.*, 1997). A *Pichia acaciae* killer törzsei két lineáris plazmiddal pPac1-1 (13,6 kbp) és pPac1-2 (6,8kbp) rendelkeznek (Worsham & Bolen, 1990). A *P.*

inositovora toxint termelő törzsei ugyan három lineáris plazmidot hordoznak, de ezek közül csak kettő (pPin1-1 és pPin1-3) jelenléte szükséges a killer fenotípus kifejeződéséhez (Hayman & Bolen, 1991).

Bár a legtöbb toxintermelő törzs esetében feltételezték, hogy a toxin kromoszómálisan kódolt, ez csupán néhány esetben igazolódott. *Saccharomyces cerevisiae* KHR (killer of heat resistant) és KHS (killer of heat susceptible) toxinjáról azonban bizonyították, hogy magi DNS-en kódolt (Goto *et al.*, 1990). A *Hansenula mrakii* HMK (*Hansenula mrakii* killer) és a *H. saturnus* HSK (*Hansenula saturnus* killer) toxin valamint a *Pichia farinosa* SMK toxin génjét szintén kromoszómális DNS-en azonosították (Kimura *et al.*, 1993; Suzuki & Nikkuni, 1994).

2.3.4. Toxinok érése, a gazdasejt génjeinek szerepe

A toxinok érése és kijutása a sejtből szintén a *S. cerevisiae* K1 és K28 toxinfehérjéi esetében a legjobban tanulmányozott. Bár mind aminosav-összetételükben, mind hatásmódjukban igen eltérők, szintézisüket, érési folyamataikat és szekréciójukat tekintve hasonlóak. Mindkét toxin preprotoxin formájában szintetizálódik, majd az endoplazmatikus retikulumon (ER), a Golgi-apparátuson és a szekréciós vezikulumokon keresztül, poszt-transzlációs modifikációkon átesve jut ki a sejtből az érett toxin. Ezeket a folyamatokat mindvégig a gazda élesztő fehérjéi végzik és kontrollálják. Mutációs analízis eredményei kimutatták, hogy a preprotoxin N-terminális része egy erősen hidrofób szekréciós szignál, melyek segítségével képes az endoplazmatikus retikulumba lépni. Ezt követően három alegység található, az α, a γ, és a β. A γ-alegység a poszttranszlációs modifikációk során erősen glikolizálódik, majd kivágódik, így az érett toxinban már csak az α és a β alegység található meg, melyek diszulfidhíd-kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A γ-alegység kivágódásában szerepet játszó enzimek felfedezéséhez K1 és/vagy K28 toxint termelő törzsek olyan mutánsainak vizsgálata vezetett, melyek nem szekretáltak biológiailag aktív toxint, ám immunitásuk a toxinnal szemben megmaradt. A mutációkért felelős két gént, a KEX1-t és a KEX2-t (killer expression) azonosították, majd kiderítették, hogy két fehérjehasító enzimet kódolnak. A KEX1 gén terméke egy szerin karboxipeptidáz (Kex1p), míg KEX2 gén terméke egy szubtilizin-szerű endoproteáz (Kex2p) (Riffer *et al.*, 2002). Mivel ezek a folyamatok nem

csak a toxinfehérjék, hanem más eukarióta extracelluláris fehérjék termelésében is szerepet játszanak, ezek tanulmányozása jelentős szerepet játszott az eukarióta proteinszintézisnek, szekréciónak és az ezekben szerepet játszó enzimek és szignálszekvenciák szerepének pontosabb megértésében. Magasabbrendű eukarióta sejtek prohormon-konverziója és proinzulin-érése például igen homológ K1 és K28 toxinok szekréciójával (Schmitt & Breinig, 2002).

Az *Ustilago maydis* toxinjai szintén preprotoxinként szintetizálódnak, majd poszt-transzlációs modifikációk során mennek keresztül, míg a KP1 és a KP6 eléri két alegységes, ill. a KP4 az egy alegységes érett formáját. A KP6 éréséhez szükséges hasításokat egy kex2-szerű fehérje végzi. A KP1 és KP2 két-két alegysége nem köt kovalensen egymáshoz (Tao *et al.*, 1990).

A gazdasejt hasító enzimein kívül számos fehérje szükséges a toxin megfelelő szekréciójához. Ezek az élesztő saját extracelluláris proteinjeinek és glikoproteinjeinek szekréciójában szintén szerepet játszó SEC gének által kódolt fehérjék. A toxint kódoló vírusok fennmaradását, replikációját szintén befolyásolja bizonyos gazdagének működése. Ezek a gének két csoportba sorolhatók: MAK (maintance of killer) és SKI (superkiller) gének. Míg előbbi deléciója a killer fenotípus elvesztésével jár, utóbbi épp ellenkezőleg, toxintúltermelést idéz elő (Wickner, 1996; Magliani *et al.*, 1997). A vírus fennmaradásához szükséges MAK gének termékei közt találhatunk N-acetiltranszferázt (Mak3p), DNS-topoizomeráz I-et (Mak1p), membránkötött (Mak11p), valamint sejtciklusszabályozó fehérjét (Mak16p). A legtöbb ide tartozó gén terméke azonban riboszómális protein, melyek a 60S riboszómális alegység összeszerelődéséhez szükségesek. Az SKI gének *in vivo* funkciója egyrészt a non-poly(A) mRNS transzlációjának blokkolása (valószínűleg a 60S riboszómális alegység csatlakozásának gátlásán keresztül), másrészt az exoszóma komplex tagjaiként szerepük lehet a 3'-5' mRNS-degradációban. Ezek a funkciók egyfajta antivirális védelmi rendszert alkothatnak. Elvesztésük szuperkiller élesztőkben a toxintermelés és szekréció mértékének növekedéséhez vezet. Mint a fentiekből kiderül, a toxin termelődését és az ezért felelős dsRNS-vírusok fenntartását számos olyan géntermék szabályozza, melyek élesztőkben egyéb fontos folyamatok (poszt-transzlációs modifikáció, fehérjeszekréció, sejtciklus-szabályozás, mRNS-transzláció/degradáció, antivirális védelem) megfelelő

működését biztosítják. Mindezek kiváló eukarióta modellekké teszik a *S. cerevisiae* és egyéb élesztők killer rendszereit e folyamatok vizsgálatára (Schmitt & Breinig, 2002).

2.3.5. Hatásmechanizmus

2.3.5.1. Sejtek felismerése, toxin aktív komponensének transzportja a célmolekulákhoz

Az érzékeny sejtek felismerése, illetve a sejt belsejébe jutás *S. cerevisiae* K1, K2 és K28 toxinja esetében kétlépéses, receptormediált hatásmechanizmussal valósul meg. Az első lépésben a toxin specifikusan köt a szenzitív sejt falának valamely komponenséhez pl. β-1,6-glükánhoz a K1 ill. K2 toxin esetében (Hutchins & Bussey, 1983), ill. a K28 toxinnál α-1,3-mannoproteinhez (Schmitt & Radler, 1987). Más élesztők toxinjainál, például *Kluyveromyces lactis* zymocinjánál kitinhez való kötődést is leírtak (Jablonowski *et al.*, 2001). Ezt követően a toxin aktív alegysége a citoplazmamembránhoz jut, ahol kölcsönhatásba kerül egy másodlagos receptorral, majd a K1 és K2 toxin a membránon, a K28 toxin pedig a sejt belsejébe, majd a sejtmagba jutva kifejti hatását. A sejtfalhoz történő kötődés gyors, energiát nem igénylő, míg a sejtmembránhoz való kapcsolódás lassabb, energiabefektetéssel járó folyamat (Bussey *et al.*, 1990; Magliani *et al.*, 1997; Schmitt & Breinig, 2002). A kötődés erősen pH-függő, mely magyarázhatja a toxinok szűk pH-optimumát. A toxin specificitásáért elsősorban valószínűleg a sejtfalon található receptor felelős (Golubev, 2006). A toxin sejtfali receptorhoz való kötődésének célja lehet még a toxin helyi koncentrációjának növelése, ill. a membránreceptorhoz való közelség biztosítása. A sejtfali receptorok és rezisztens mutánsok tanulmányozása nagymértékben hozzájárult az élesztősejtfal felépítéséről, funkciójáról szerzett ismereteink bővítéséhez (Stratford, 1994).

Míg a K28 toxin plazmamembrán-receptora még ismeretlen, a K1 toxin receptorát már azonosították, ez a Kre1p (Killer resistance). A Kre1p egy O-glikolizált, glikozilfoszfatidilinozitol (GPI: glycosylphosphatidylinositol) horgonyzott sejtfelszíni fehérje, mely a sejtfal β-1,6-glükán bioszintézisében is szerepet játszik (Breinig *et al.*, 2002; 2004).

A K28 toxin sejtbe jutása endocitózissal valósul meg, majd a toxin a szekretórikus rendszeren (Golgi-apparátus, ER) visszafelé haladva jut el végcéljához. Ez az

úgynevezett retrográd transzport nagyban függ egy rövid, négy aminosavból álló motívum (HDEL) jelenlététől a toxin β-alegységének C-terminálisán. Ez a szignál irányítja vissza a toxint a korai endoszómális kompartmentekből a transz-Golgi hálózatba, így megvédve a toxint a vakuolumokba jutástól, ahol fehérjebontó enzimek degradálnák. A HDEL motívum szintén megtalálható élesztők ER fehérjéiben, ahol szerepe e fehérjék visszajuttatása a Golgi-apparátusból az ER-ba. Emlőssejtek esetén ezt a funkciót a KDEL motívum látja el. Hasonló szignálmotívumok bakteriális és növényi toxinokban (*E. coli* hőérzékeny toxinja, koleratoxin, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A) is megtalálhatók, melyek szintén a retrográd transzportot segítik. Bakteriális toxinok esetében nem jelent problémát a HDEL jelenléte, a K28 azonban eukarióta sejtben szintetizálódik, így HDEL motívuma nem lehet szabadon a szekretórikus út során. Ezért a szintetizálódott preprotoxinon a HDEL motívum maszkírozott, míg a transz-Golgi kompartmentig el nem jut, ahol poszt-transzlációs modifikáció során Kex1p hasítása révén a toxin intracelluláris szignálja szabaddá válik. Miután a K28 toxin bejutott az érzékeny sejtek citoszóljába két alegysége a redukáló közeg hatására disszociál. Míg a β-alegység ubiquitinálódik, majd degradálódik, az α-alegység eljuttatja a toxin szignált a sejtmagba, ahol végül kifejeződik letális hatása. Az, hogy α-alegység bejut-e a sejtmagba, vagy a citoszólban egy vagy több fehérjével kölcsönhatva fejti-e ki hatását, még nem tisztázott. (Eisfeld *et al.*, 2000)

Az *Ustilago maydis* toxinjai közül a KP6 a legjobban tanulmányozott. Ismert, hogy két alegysége (VP 10 vagy α, valamint VP 12,5 vagy β) külön monomerekként funkcionálnak. Először az α-alegység lép kölcsönhatásba az érzékeny sejttel, a β-alegység csak az α-alegyéggel már kapcsolatba lépett sejteken fejti ki hatását (Peery *et al.*, 1987). A toxin sejtfali receptora még nem ismert, de mivel szferoplasztok nem érzékenyek a toxinra, az valószínűleg kötődik a sejtfalhoz (Steinlauf *et al.*, 1988).

2.3.5.2. Killer toxinok hatásmódja

A különböző killer toxinok igen eltérő hatásmechanizmussal rendelkeznek. A legtöbb ismert killer toxin a plazmamembránt támadja. A *Saccharomyces cerevisiae* K1 toxinja TOK1 csatornát aktiválja (Ahmed *et al.*, 1999), 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 *et al.*, 1995), indukálhatják a sejtciklus leállását a G1/S-fázisban, valamint gátolhatják a DNS-szintézis (Schmitt *et al.*, 1996). A *Kluyveromyces lactis* által termelt zymocin esetében megállapították, hogy a G1 stop hátterében speciálisan módosított tRNS-molekulák hasítása áll (Jablonowski & Schaffrath, 2007). A *Pichia acaceae* PaT toxinjának DNS-károsító hatása programozott sejthalált indukál az érzékeny sejtekben (Klassen *et al.*, 2007). Az utóbbi két toxin új, - az előbbi mechanizmusoktól független - párosodást és reprodukciót gátló hatását is leírták (Klassen *et al.*, 2006).

2.3.6. Immunitás-faktor, rezisztens törzsek

Mint említettük, a termelő törzsek immunisak saját toxinjukra. Azonban az ezért felelős immunitás-faktor, ill. annak pontos molekuláris szerepe még a legjobban tanulmányozott *S. cerevisiae* toxinok esetében sem tisztázott. Az viszont ismert, hogy a Δkex2 mutánsok, melyek nem képesek preprotoxin hasítására, tehát a γ-alegység nem vágódik ki az α- és β-alegység közül, toxint nem termelő, de immunis fenotípussal rendelkeznek. Ez K1, K2 és K28 toxint termelő törzsekre egyaránt igaz. Feltételezések szerint a γ-alegység amellett, hogy intramolekuláris chaperonként biztosítja a toxin érését és szekrécióját, az immunitásért is felelős. Bár a K1 toxin esetében valószínűleg előbbiben lehet nagyobb szerepe, mivel a γ-alegység inszerciós és szubtitúciós mutációi a toxintermelést jelentősen csökkentették, ám az immunitásra kevésbé voltak hatással. Az immunitásért feltehetően inkább az éretlen preprotoxin a felelős, mely a sejten belül a toxin α-alegységén keresztül célmolekulájával (TOK1 membráncsatornával) kölcsönhatva komplexet képez, szupresszálva ezzel a membrán külső oldalán támadó toxin aktiváló hatását (Sesti *et al.*, 2001). Ezt igazolják azok az eredmények, melyek szerint az immunitás kialakításához a teljes α-alegységre, és a γ-alegység 31 aminosav hosszúságú szakaszára van szükség (Zhu *et al.*, 1993). A K28 toxin esetében azonban egész más mechanizmust kell feltételezni, mivel kimutatták, hogy a K28 toxint termelő élesztők szekréciójukat követően felveszik saját toxinjukat. Sőt, a toxin visszalépve a szekréciós útba, retrográd transzport során eljut a citoszólba is ugyanúgy, mint érzékeny törzsek

esetén. A prekurzor és az aktív toxin valószínűleg komplexet képez, majd degradálódik (Breinig *et al.*, 2006).

Az *Ustilago maydis* toxinjainak immunitásért felelős faktora valószínűleg nem kapcsolódik a toxin prekurzoraihoz, mint a *S. cerevisiae* esetében. A KP1 törzseknél az immunitás az L vírusszegmenthez kapcsolható, míg a KP4 és KP6 toxinnal szembeni immunitásért egy recesszív kromoszómális mutáció tehető felelőssé (Finkler *et al.*, 1992).

2.3.7. Killer toxinok felhasználási lehetőségei

A fent említett tudományos kutatásokban betöltött szerepük mellett a killer toxinok számos más alkalmazásra adnak lehetőséget.

2.3.7.1. Taxonómiai felhasználás

Mivel a toxinok specificitását a sejtfali receptor felismerése adja, a sejtfal strukturális és biokémiai felépítése pedig fontos rendszertani bélyeg, a killer toxinokra való érzékenységi mintázatok taxonómiai jelentőséggel bírhatnak (Golubev & Boekhout, 1995). A mikocinek segítséget nyújthatnak a közeli rokon szervezetek taxonómiai problémáinak megoldásában, ill. a különböző törzsek gyors elkülönítésében. A *Cryptococcus nemorosus sp. nov.* és a *C. perniciosus* új fajként történő leírása során például a *C. laurentii* típustörzstől eltérő mikocin-érzékenységet és termelési mintázatot írtak le. Utóbb a fajok elkülönülését molekuláris módszerek is megerősítették (Golubev *et al.*, 2003). Mindemellett, a killer toxin érzékenységi mintázatok, KSP-k (killer sensitivity patterns) taxonómiai felhasználásánál problémát jelent, hogy az általánosan használt biotesztek nem képesek elkülöníteni a sejtfal változásaiból következő ill. más faktorok által meghatározott érzéketlenséget. Rezisztens törzsek általában nem rendelkeznek az érzékenységhez szükséges sejtfali receptorral, míg az immunis vagy neutrális törzsek hordozzák ugyan a sejtfali receptort, ám rendelkeznek a toxintermelő törzsek immunitás-faktorával. Ez utóbbi pedig elfedheti a taxonómiai szempontból jelentős sejtfali különbségeket. További nehézséget okozhat rezisztens mutánsok megjelenése. Egyes tanulmányok arra utalnak, hogy mivel a különböző földrajzi területről származó törzsek eltérő KSP-t mutatnak, az ökológiai körülmények nagyobb mértékben befolyásolják a killer-szenzitív kölcsönhatások kialakulását, mint a filogenetikai hatások (Pintar &

Starmer, 2003). Mindemellett több ismert, és egymástól eltérő hatásspektrumú toxin együttes használatával a killer toxinok egyéb taxonómiai módszerek hasznos kiegészítő eszközei lehetnek az élesztők osztályozásában (Golubev, 2006).

2.3.7.2. Ipari, gyógyászati felhasználás

Különböző fermentációs eljárások során termelő törzsek starter kultúrába való oltásával nem kívánatos, a végtemék minőségét lerontó kontamináns élesztők eliminálhatók (Young, 1981; Bortol *et al.*, 1986; Michalcakova *et al.*, 1993).

Killer toxinokat termelő törzsek az élelmiszerek tárolása során biokontroll szerepet tölthetnek be (Palpacelli *et al.*, 1991). Felhasználhatók lehetnek ochratoxint termelő fonalasgombák ellen (Bleve *et al.*, 2006). A *Candida nodaeinsis* széles hatásspektrumú toxinja magas sókoncentrációjú közegben aktív, így a nagy sótartalmú élelmiszereket megvédheti a halotoleráns élesztőkkel szemben (Silva *et al.*, 2007).

A dsRNS-vírusok által kódolt toxinok killer-rendszerei igen jó modellként szolgálhatnak antivirális szerek felfedezésére irányuló screening-vizsgálatok során. (Pan *et al.*, 2007)

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, poszt-transzlációs modifikációkat véghezvinni, mint a fehérje N-glikolizálása, foszforiláció, vagy az acetiláció. Mindezért az egysejtű eukarióta élesztőket, mint a *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* és *Schizosaccharomyces pombe* egyre gyakrabban használják heterológ fehérjék termelésére (Romanos *et al.*, 1992). A szekrécióra szánt fehérjének rendelkeznie kell egy N-terminális szignál-szekvenciával, mely az eukarióta szekréciós útra irányítja az ER-en majd a Golgi-hálózaton keresztül. Ezt a szekréciós szignált biztosíthatja a killer toxin plazmidja *K. lactis*, vagy vírusa *S. cerevisiae* ScV-M28 esetében. Így killer rendszerek segítségével termeltethető számos, gyógyszeriparnak fontos szekréciós fehérje, mint az α-amiláz, a humán antitrombin III vagy a méhlepény savas foszfatáza (Tokunaga *et al.*, 1993).

Killer törzsek növénypatogén élesztők ellen felhasználhatók biokontroll ágensként ill. a toxint kódoló gén bejuttatása útján gombafertőzésnek ellenálló, transzgénikus növények állíthatók elő. Az *Ustilago maydis* KP4-es toxinjának génjét tartalmazó, *U. tritici* ill. *Tilletia caries* gombafertőzéseknek ellenálló transzgénikus búza kifejlesztése már a szabadföldi tenyésztéses kísérletek fázisába jutott (Schlaich *et al.*, 2007).

Patogén ill. ipari szempontból fontos, szabadalmaztatott élesztő- ill. fonalasgomba-törzsek biotipizálása killer szenzitivitás mintázat (KSP) alapján olcsóbb, könnyebben kivitelezhető megoldást jelent, mint az általánosan használt molekuláris módszerek, pl. mtDNS-RFLP, PFGE vagy a különböző PCR-alapú technikák. A módszer azonban nehezen standardizálható, a gátlási zónák meghatározása erősen szubjektív lehet, főleg kis mértékű inhibíció esetén. Részlegesen tisztított toxinok ill. számítógépes képelemző programok alkalmazásával nagyobb megbízhatóság érhető el, azonban a tisztítás elvégzésével a kivitelezés bonyolultabbá és időigényesebbé válik (Buzzini *et al.*, 2007). Boekhout és Scorzetti *C. neoformans* biotipizálása során összehasonlították a RAPD és KSP módszerek hatékonyságát. Kísérleteik során RAPD-analízissel több csoportot kaptak, de a *C. neoformans* két varietasa (var. *neoformans* és var. *gattii*) mindkét esetben elkülönült egymástól (Boekhout & Scorzetti, 1997). Mivel a különböző molekuláris ill. KSP alapú módszerek más-más mechanizmus alapján fedik fel a különbségeket a törzsek között, ezek együttes alkalmazása hatékonyabbá teheti a biotipizálást (Corte *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2006).

Killer toxinok felhasználhatók állatokat fertőző patogén élesztők ellen. A *Pichia anomala* által termelt toxin például a Kínában tenyésztett *Portunus trituberculatus* rákot támadó *Metschnikowia bicuspidate* fajjal szemben bizonyult hatásosnak. Nisztatin, benzalkonium-bromid ill. bizonyos növényi kivonatok hatásosak ugyan a fertőző gomba ellen, azonban csak olyan nagy koncentrációban, mely már a rák szervezetére is káros, valamint alkalmazásuk nyílt tengerben igen költséges lenne. Mindezért killer fenotípuson alapuló biológiai védekezés kidolgozása igen kedvező lenne (Wang *et al.*, 2007).

Új és szelektív antifungális szerek utáni kutatás során a gombasejtfal komponensei kiváló célmolekulákat jelentenek, mivel ezek a képletek általában nem fordulnak elő emlőssejtekben. Az élesztősejtfal felépítésében lényegében egy külső

elektrondenz mannoproteinréteg, egy lineáris és elágazó β-glükánokból álló glükánváz és kisebb menyiségű kitin vesz részt (Lesage & Bussey, 2006). Mivel e komponensek mindegyikéről bebizonyosodott, hogy valamely toxin elsődleges kötőhelyei és sejtfali receptorai (Hutchins & Bussey, 1983; Schmitt & Radler, 1987; Jablonowski *et al.*, 2001), felmerült a killer toxinok új antifungális szerként való használatának lehetősége (Theisen *et al.*, 2000; Selitrennikoff, 2001). A killer toxinok azonban általában érzékenyek proteázokra, antigénikus hatásúak, 37˚C-on illetve pH 7-en inaktívak, így közvetlenül orálisan vagy intravénásan nem alkalmasak patogén gombák okozta szisztémás fertőzések gyógyítására. Bőrgombák felszíni kezelésére azonban felhasználhatók, ill. mechanizmusuk pontosabb megismerésével új antifungális szerek kifejlesztéséhez járulhatnak hozzá (Polonelli *et al.*, 1986; Polonelli *et al.*, 1991; Seguy *et al.*, 1998). Napjainkban killer toxinok aktív centrumát leképező antiidiotipikus antitestek előállításával kísérleteznek, melyek megőrzik antifungális hatásukat, viszont jóval stabilabbak, mint az eredeti toxin (Polonelli *et al.*, 1997). Mivel egyre több klinikai jelentőségű patogén faj (*Candida albicans, Pneumocystis carnii, Cryptococcus neoformans*) bizonyul érzékenynek az újonnan felfedezett toxinok valamelyikére, ezek használata a gyógyászatban mindenképp jelentős előny lenne az egyre nagyobb gyakorisággal előforduló, és az alkalmazott antifungális szerekre egyre szélesebb körben rezisztens törzsek által okozott gombafertőzések legyőzésében (Magliani *et al.*, 1997).

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált törzsek

3.1.1. *Filobasidium capsuligenum* törzsek

F. capsuligenum Rodrigues de Miranda comb. nov. (Rodrigues de Miranda 1972)

- IFM 40078 (CBS4736)
- NCAIM Y-01177
- NCAIM Y-01226
- VKM Y-1513 (CBS 1906)
- VKM Y-2623 (CBS 4381)
- NCAIM Y-00469
- NCAIM Y-00472
- CBS 6122
- CBS 4173
- CBS 6219

3.1.2. *Cryptococcus neoformans* törzsek

- IFM 5844 *C. neoformans var. neoformans* α (D szerotípus), csonttumorból
- IFM 5845 *C. neoformans var. neoformans* **a** (D szerotípus)
- IFM 48637 (CBS 132) *C. neoformans var. neoformans* (D szerotípus)
- IFO 410 *C. neoformans var. grubii* (A szerotípus), AIDS-es betegből
- WM 148 *C. neoformans var. grubii* (A szerotípus), Sydney, betegből
- WM 626 *C. neoformans var. grubii* (A szerotípus), Sydney, betegből
- WM 628 *C. neoformans var. hybrid* (A/D szerotípus), Melbourne, betegből
- WM 629 *C. neoformans var. neoformans* (D szerotípus), Melbourne, betegből
- WM 179 *C. neoformans var. gattii* (B szerotípus), Ausztrália, betegből
- WM 178 *C. neoformans var. gattii* (B szerotípus), Ausztrália, betegből
- WM 161 *C. neoformans var. gattii* (B szerotípus), Ausztrália, eucalyptus sp.-ből
- WM 779 C. *neoformans var. gattii* (B szerotípus), Ausztrália, betegből

3.1.3. További törzsek

Az általunk izolált *Cryptococcus* törzseket, ill. további toxintermelésre és érzékenységre tesztelt törzseket a Függelékben soroljuk fel.

3.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

3.2.1. Törzsek növesztésére és fenntartására használt táptalajok, tápoldatok

- YM-malátás táptalaj:
  - 3% malátakivonat
  - 0,5% élesztőkivonat
  - 1% glükóz
  - (3% agar)
- 2 x YPD
  - 1% élesztőkivonat
  - 2% pepton
  - 2% glükóz
  - (3% agar)

3.2.2. Toxintermelés körülményeinek optimalizálására használt tápoldatok

- YM4
  - 3% malátakivonat
  - 0,5% élesztőkivonat
  - 1% glükóz
  - (3% agar)
  - pH 4 citrát-foszfát pufferrel
- 2YPD4
  - 1% élesztőkivonat
  - 2% pepton
  - 2% glükóz
  - pH 4 citrát-foszfát pufferrel
- VMM4 vitaminos minimál táptalaj
  - 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

- pH 4 citrát-foszfát pufferrel

3.2.3. Párosodási típus meghatározásához használt táptalajok

- *C. neoformans* párosodási típus meghatározásához: szénás táptalaj

  50 g szénát 1000 ml desztilált vízben 30 percig kuktáztunk, majd leszűrtük. Feloldottunk benne 2g K_2HPO_4-ot és 15g agart, majd a pH-t HCl-dal 6,2-re állítottuk.

- *F. capsuligenum* párosodási típus meghatározásához: kukoricalisztes táptalaj

  12,5 g kukoricalisztet 300 ml desztillált vízben vettünk fel, 60 °C-on melegítettük 1 órán keresztül, majd vattán leszűrtük. A térfogatot kiegészítettük 300 ml-re, 3,8 g agart adtunk hozzá, majd sterileztük.

3.2.4. *Cryptococcus* törzsek izolálásához használt táptalajok

- Napraforgós táptalaj:

  1 liter táptalajhoz 45 g napraforgót megpirítottunk és összetörtünk. 1000 ml vizet adtunk hozzá, azután 15 percig forraltuk. Átszűrtük vattán, majd vízzel 1000 ml-re egészítettük ki. Hozzáadtunk 1g NaCl-t, 10 g glükózt, 2,5 g élesztőkivonatot, 2,5 g peptont, és 20 g agart. Autoklávoztuk, majd kiöntés előtt 0,05g klóramfenikolt adtunk hozzá.

- L-DOPA táptalaj (Polacheck & Kwon-Chung, 1988)
  - 15 mM glükóz
  - 10 mM $MgSO_4$

- 29,4 mM KH_2PO_4
- 13 mM glicin
- 3,0 μM tiamin
- 1,0 mM L-DOPA (Sigma)
- 2% agar

- Nitrit asszimiláció vizsgálatához használt tápoldat
  - 10x-es koncentrációjú tápodat
    - 11,7 g Bacto Yeast Carbon Base
    - 0,26 g Nátrium nitrit
    - 100 ml desztillált víz
    - Szűréssel sterilizáljuk, majd hűtőben tároljuk

3.3. Egyéb felhasznált oldatok, reagensek

- Nukleinsav-izoláláshoz használt oldatok:
  - LETS-puffer: 0,1 M LiCl, 10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 0,5% SDS
  - TE-puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
  - PCI: fenol:kloroform:izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke
  - CI: kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú keveréke
- Nukleinsav gélelektroforéziséhez használt oldatok:
  - Etídium-bromid (SIGMA) 10%-os törzsoldata
  - TAE-puffer: 40 mM Tris/ecetsav, 1mM EDTA, pH 8
  - Agaróz (Reanal)
  - Loading puffer: 40% szacharóz, 0,25 M brómfenolkék, 0,2 M EDTA, pH 8,2
- DBB reagens
  - 1 mg/ml diazoniom blue B sót hideg, 7-es pH-jú, 0,1 M-os TRIS HCl pufferben oldunk.
- SDS gélelektroforézishez használt oldatok:
  - Gél: NuPAGE Bis-Tris HCL 4-12% grádiens koncentrációjú poliakrilamid gél

- Gélkazetta: Sztirén kopolimer alapú, 10x10 cm
- 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: Simply Blue^{TM} Safestain (Invitrogen)

3.4. Fenotípus-vizsgálatok

3.4.1. Killer-fenotípus meghatározása

Érzékeny törzs 1-2 napos tenyészetéből szuszpenziót készítettünk (≈10^7 sejt/ml), majd masszívan oltottuk YM4 táptalajra. Ezután a termelésre tesztelt törzs idősebb, 4-7 napos tenyészetéből készült tömény szuszpenzióból (≈10^8) 25 µl-t a masszív oltás felszínére pipettáztunk. A gátlási zónákat 24-48 óra 20 °C-on történő inkubálást követően olvastuk le.

3.4.2. Killer toxin fermentálása

A termelő törzset (*Filobasidium capsuligenum*) 24 óráig 2x-es YPD táptalajon neveltük, majd a sejteket lecentrifugáltuk. A fermentlevet Millipore membránon (0,45 µm) sterilre szűrtük.

3.4.3. Párosodási típus meghatározása

Párosodási típus meghatározásához ismert mating-típusú referenciatörzs fiatal tenyészetéből egy kacsnyit összekevertünk a vizsgált izolátum azonos mennyiségével szénás, ill. kukoricalisztes talajon. 20 °C-on inkubáltuk, folyamatosan ellenőrizve a hifaképződést.

3.4.4. Izolált *Cryptococcus*-ok azonosítására irányuló kísérletek

- Minta feldolgozás, melanin képzés tesztelése

  5 g mintát feloldottunk 45 ml 0,005%-os dioktil-nátrium-szulfoszukcinátban, majd 30 percig mágneses keverővel kevertettük. Fél órát hagytuk ülepedni, majd a felső részből valamint annak 10-szeres, 100-szoros és 1000-szeres hígításából 50µl-t szélesztettünk napraforgós táptalajt tartalmazó csészékre 5-5 párhuzamosban. 5-10 napig inkubáltuk 25°C-on, 3 lépésben tisztítottuk azokat a telepeket, melyek barnás színűek lettek a táptalajon. Ezt követően L-DOPA táptalajon ellenőriztük a melanin-képzést.

- Törzsek tisztítása

  A törzseket malátás táptalajon történő szélesztéssel tisztítottuk, hátom lépésben.

- Diazonium blue B (DBB) teszt

  A törzseket malátás táptalajra szélesztettük, majd legalább 10 napig inkubáltuk 30°C-on. Az elöregedett tenyészetet 55°C-on tartottuk 5-6 órán keresztül, majd jéghideg DBB-reagenssel leöntöttük. Ha szobahőmérsékletetn két percen belül sötétvörösre változott a telep színe, akkor az eredmény pozitív volt.

- Szerotípus-meghatározás

  A törzseket Crypto Check (Iatron Labs, Japán) segítségével szerotipizálták (Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis Chiba University, Japán)

- *Erjesztés vizsgálata*

  Az erjesztőcsöveket egyenként sapkáztuk, majd sterileztük. A csövekbe 2,5-2,5 ml tápoldatot pipettáztunk. 0,025-0,025 ml-nyi szuszpenziókkal (1 kacs/2,5 ml) beoltottuk a csöveket. Cukronként és kontrollonként 3-3 párhuzamos oltást végeztünk. Minden csőbe steril vazpart (vaselin-paraffin) öntöttünk kb. 1 cm magasan, majd 30°C-on inkubáltuk. A csöveket 48 óra ill. 5 nap után értékeltük. Az eredmény pozitív volt, ha a tápoldat színe sárgára változott.

- *Különböző hőfokon való növekedési képesség vizsgálata*

  A különböző hőfokon való növekedési képesség vizsgálatát malátás-oxoidos táptalajon végeztük. A törzsek szuszpenzióiból csíkot húztunk a táptalajra, majd 2-3 napig a vizsgált hőmérsékleten inkubáltuk, ill. kontrollként párhuzamos oltásokat végeztünk, a csészéket 25°C-on növesztettük. Ha a törzs a vizsgált hőmérsékleten inkubálva nőtt, az eredmény pozitív.

- *Nitrit asszimiláció vizsgálata*

  50 ml-es Erlenmeyer lombikba 4,5 ml steril desztillált vízben 0,5 ml-t oldotunk fel a koncentrált tápoldatból. A tápoldatokba 0,1 ml sejt szuszpenziót oltottunk. Negatív kontrollként nitrogén-forrás nélküli tápoldatot használtunk. Mivel lehetséges, hogy a növekedés még a sejtben felhalmozott nitrogén-forrásból ered, ezért 3-7 nap 37°C-on való rázatás után újabb lombikba oltottunk át az elsőből egy kacsnyit (4 mm átmérő). Ha 3-4 nap rázatás után a tápoldat elopálosodott, elfehéredett, az eredmény pozitív volt.

3.5. Genotípus-vizsgálatok

3.5.1. Nukleinsav-izolálás (Leach *et al.*, 1986)

0,2 g liofilizált sejtet dörzsmozsárban alaposan elporítottunk, 2 ml LETS pufferben felvettük, majd vortexeltük. Ezután 2 ml fenolt (PCI) adtunk hozzá, és újabb vortexelést követően 10 percig 3000 rpm-el centrifugáltuk. A fenolozást megismételtük, majd a felülúszót kloroform-izoamilalkohollal (CI) mostuk. A DNS-t kétszeres térfogatú etanollal kicsaptuk, 70% alkohollal mostuk, majd beszárítottuk és 100 µl TE-ben felvettük. PCR és mtDNS-RFLP reakcióhoz az elegyhez 10 mg/ml koncentrációban RNázt adtunk, majd fél óráig 37 °C-on inkubáltuk. Ezután a DNS-mintákat felhasználásukig -20 °C tároltuk.

3.5.2. Nukleinsavak analízise

A DNS-fragmenteket 0,8 ill. 1,5% agaróz gélen választottuk el standard módszerek használatával (Sambrook & Fritsch, 1989). A géleket etídium-bromiddal festettük, és UV-világítás alatt vizsgáltuk.

3.5.2.1. PCR-reakció ITS- és D1/D2-szekvencia analízishez

- ITS-primerek (White *et al.*, 1990):
  - ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)
  - ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)
- D1/D2 régió amplifikálásához használt primerek (Fell *et al.*, 2000)
  - LR3 (GGTCCGTGTTTCAAGACG)
  - F63 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG)
- PCR-reakció (gép típusa: PTC-100-60, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)

- 50 µl-es reakciók
    - 200-200 µM dNTP
    - 1-1 µM primer
    - 2,5 U Taq DNS polimeráz
    - 200 ng DNS minta
    - 5 µl 10x reakciópuffer (Zenon-Bio Ltd., Szeged, Hungary)
- A PCR lépései:
    - Denaturáció (94 °C, 5 perc)
    - 35 ciklus: denaturáció (94 °C, 1 perc)
      "annealing" (55 °C, 1 perc)
      elongáció (72 °C, 2 perc)
    - Elongáció (72 °C, 5 perc)

3.5.2.2. DNS-szekvenálás

A PCR-termékeket elektroforézissel választottuk el, majd a DNS fragmenteket 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.

3.5.3. RAPD-analízis, PCR-fingerprinting

- Felhasznált primerek
    - RAPD-analízishez
        - OPO-12 (CAGTGCTGTG)
        - OPG-19 (GTCAGGGCAA)
        - OPR-15 (GGACAACGAG)
    - PCR-fingerprinting-hez
        - M-13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3')
        - $(GACA)_4$

- PCR-reakció (gép típusa: PTC-100-60, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)
  - 25 µl-es reakciók
    - 100-100 µM dNTP
    - 0,2 µM primer
    - 0,5 U Taq DNS-polimeráz
    - 50 ng DNS-minta
    - 2,5 µl 10x reakciópuffer (Zenon-Bio Ltd., Szeged, Hungary)
  - A PCR lépései:
    - Denaturáció (92 °C, 5 perc)
    - 45 ciklus: denaturáció (92 °C 1 perc)
      "annealing" (35 °C 1 perc)
      elongáció (72 °C 2 perc)
    - Elongáció (72 °C 5 perc)

3.5.4. mtDNS RFLP

A mtDNS-RFLP analízis során a totál DNS kivonatot GC tartalmú felismerőhellyel rendelkező enzimekkel, *Hae*III-mal és *Hha*I-gyel emésztettük a gyártó (Fermentas) utasításai szerint végeztük 100 µl térfogatban, 25 µl DNS mintával. Az oldatot ezután kétszeres térfogatú alkohollal kicsaptuk, majd beszárítottuk. A mintát 20 µl-ben vettük fel, majd 1%-os TBE-gélen elektroforézissel elválasztottuk a fragmenteket.

3.6. Filogenetikai analízis

3.6.1. DNS-szekvenciaadatok értékelése

Szekvenciák illesztését (alignment) CLUSTALW programmal végeztük (Thompson *et al.*, 1997).

3.6.2. Fenogram készítése PCR-fingerprinting, RAPD- ill. mtDNS RFLP-adatok alapján

A PCR-fingerprinting, RAPD- valamint mtDNS RFLP-adatok felhasználásával készült távolsági mátrixokat a Phylogenetic Computer Tools Version 1.32 (Buntjer, 2001) programmal állítottuk elő, a Jaccard koefficiens felhasználásával. A fenogramok a PHYLIP (Phylogeny Inference Package) programcsomag 3.65 verziójával készültek, neighbor-joining módszert alkalmazva a NEIGHBOR program segítségével (Felsenstein, 2004). A kapcsolatok alátámasztására 1000 ismétlésből származó bootstrap-értékeket szintén a Phylogenetic Computer Tools Version 1.32 program segítségével generáltuk.

3.7. Toxinok biokémiai természetének meghatározása

3.7.1. Toxintartalmú fermentlé előállítása

Az IFM40078-as törzs friss tenyészetének 10^4 sejtjét leoltottunk 100 ml 0,1 M citrát-foszfát tartalmú YM4-be. 24 óráig tenyésztettük 23-25 ºC-on, majd sterilre szűrtük.

3.7.2. Hőmérséklet-optimum meghatározása

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

3.7.3. 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.

3.7.4. Proteázkezelés

A toxint tartalmazó fermentleveket egy éjszakán át inkubáltuk 20 °C-on különböző proteinázok – Proteináz K (Sigma-Aldrich, P-2308), Papain (Reanal, 25781-1-99-33), Pepszin (Boehringer Mannheim GmbH, 108057), Pronáz E (Merck KGaA, 1.07433) – 10 mg ml^{-1} koncentrációjú jelenlétében.

3.8. Toxin azonosítása, tisztítása

3.8.1. 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 felső és alsó részt kiegészítettük eredeti térfogatra, majd aktivitásukat biotesztben mértük.

3.8.2. SDS-gélelektroforézis

A vizsgálandó fermentlevek 2-2 ml-ét 80x-ra töményítettük 10 kDa pórusátmérőjű membránszűrő segítségével (amicon Microcon, YM-10). A mintákat 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.

- Gélelektroforézis paraméterei:
  - Feszültség: 200 V
  - Kezdeti áramerősség: 110-115 mA
  - Végső áramerősség: 60-70 mA
  - Futási idő: ≈ 50 perc

A géleket az elektroforézis után 3x 10 percig mostuk bidesztillált vízben. Simply Blue (Invitrogen) festékkel festettük 1-2 órán keresztül, enyhén rázatva, majd a felesleges festéket bidesztillált vízzel kimostuk.

3.8.3. UV-mutagenezis

Az IFM 40078 törzs 2-3 napos tenyészetéből szuszpenziót készítettünk, majd Bürker-kamrás számolást követően 1000-1000 sejtet YM táptalajra szélesztettünk. A lemezeket UV-fénnyel besugároztuk 10-90 másodperces dózisokban, majd 20 °C-on inkubáltuk 10 napon keresztül. A telepek számolását követően túlélési görbét felvéve meghatároztuk azt az dózist, amely alkalmas mutánsok izolálására. 30, 40 és 50 másodperces besugárzások tűntek megfelelőnek, így a későbbiekben ezeket használtuk mutánsok előállítására. A túlélő telepek felnövekedése után átreplikáztuk őket IFM 5844 törzzsel masszívan oltott YM4 táptalajra, majd a gátlási zónát ki nem alakító telepeket tísztítottuk és átoltásokkal ellenőriztük stabilitásukat.

3.8.4. Toxin kötődése *C. neoformans* sejtekhez

A *Cryptococcus neoformans* sejteket lecentrifugáltuk, az IFM 40078 törzs toxint tartalmazó fermentlevében felvettük, hogy a sejtkoncentráció $1x10^9$, ill. $2{,}2x10^{10}$ legyen. A sejteket 30 percig 20 °C-on rázatás nélkül inkubáltuk, majd a sejteket lecentrifugáltuk. A felülúszó aktivitását biotesztben mértük.

3.8.5. Toxin tisztítása *C. neoformans* ill. *S. cerevisiae* sejtekkel

A sejteket lecentrifugáltuk (15’ 3000 rpm), 10 ml 1M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M-os, pH 4-es citrát-foszfát pufferrel 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd az újból lecentrifugált sejteket citrát-foszfát pufferrel mostuk. A sejtekre 50 ml-t öntöttünk az IFM 40078 törzs toxint tartalmazó fermentlevéből, majd 20 °C-on inkubáltuk 60 percig. Ezután a sejteket centrifugálással ülepítettük, majd 10 ml 1 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M-os, pH 4-es citrát-foszfát pufferben vettük fel. Ezután 30 perc inkubálás következett 20 °C-on rázatva, majd újabb centrifugálást (10 perc 3000 rpm) követően a felülúszót 3 M NaCl-tartalmúra egészítettük ki, és 15 percig centrifugáltuk (15000 rpm, SS-34). A csapadékokat 0,5 ml pH 4-es citrát-foszfát pufferben vettük fel. Az oldatok toxinaktivitását biotesztben mértük.

3.8.6. Affinitás-kromatográfia

- Oszlop készítése

  25 ml-es lombikban 0,7 g epoxi-aktivált sepharose 6B agarózt 2 ml UP vízben felvettünk, összekevertük, majd G3-as szűrön 300 ml UP vízzel mostuk. 55 mg pusztulánt 4 ml 0,1 M NaOH-ban oldottunk fel. A sepharose-t és a pusztulánt tartalmazó oldatokat összkevertük, majd 37 °C-on 19 órán keresztül lassan rázattuk. A gélt háromszor mostuk felváltva 100-100 ml 0,1 M NaOH-dal, majd 0,1 M ecetsav pufferrel (pH4), végül 100 ml 0,5 M NaCl-dal kiegészített 0,1 M nátrium-bikarbonát oldattal, majd 50 °C-on, 25 ml 1 M etanolaminban inkubáltuk egy éjszakán át. 100 ml 15 % glicerinnel kiegészített 0,1 M-os ecetsav-pufferrel mostuk a gélt. Felhasználás előtt 100 ml a kötéshez használt, 0,1 M-os, pH 4-es citrát-foszfát pufferrel mostuk az oszlopot.

- Kromatográfia

  2 ml pusztulánnal kapcsolt sepharose 6B gélt lombikban összekevertünk 10 ml fermentlével, majd 2 óránát lassú rázatással inkubáltuk 20-25 ºC-on. A gélt oszlopba töltöttük, majd 70 ml 0,1 M-os, pH 4-es citrát-foszfát pufferrel mostuk. 0,1 M-os, pH 6-os citrát-foszfát puffer + 1,5 M NaCl-dal mostuk, 0,5-1 ml-es frakciókat szedtünk.

- Fehérje-szekvenálás

  SDS gélelektroforézist követően a fehérjéket PVDF-membránra (Polivinilidén Fluorid) blottoltuk a gyártó utasításai szerint (Invitrogen XCell SureLock Mini-Cell rendszer). Coomassie-R 250 festést követően *N*-terminális szekvenciák meghatározását Edman degradációval végezték a Gödöllői Agrártudományi Egyetemen.

3.9. Toxin hatásmechanizmusára irányuló vizsgálatok

3.9.1. FITC festés

Toxinnal kezelt sejteket 70% etanolban fixáltunk jégen 30 percig, majd 30 g/ml koncentrációjú (0,5 mol/l $NaHCO_3$ oldatban) fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) festettük. A sejtek fluoreszcenciáját fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk. Az élő és elpusztult sejtek számát 200 sejt vizsgálatával határoztuk meg.

3.9.2. Sejtfali receptorhely azonosítása

Kereskedelmi forgalomban kapható sejtfalpolimereket 5 mg/ml koncentrációban 1 ml toxint tartalmazó fermentlével, glükózzal kiegészítve összekevertünk, egy éjszakán át inkubáltuk 20 °C-on, majd a maradék aktivitást biotesztben vizsgáltuk. A sejtek túlélésének vizsgálatához a sejtfalpolimereket és glükózt tartalmazó fermentlébe 10^5 érzékeny *C. neoformans* sejtet oltottunk. A mintákat 24 °C-on lassú rázatás mellett inkubáltuk 24 órán keresztül, majd a túlélő sejteket YM táptalajra szélesztettük és telepképző egységeket számoltunk. A felhasznált sejtfalpolimerek a következők voltak: laminarin (Sigma, Steinheim, Németország), pusztulán/β-1,6-glükán (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), mannán (Sigma) kitin oligoszacharidok (Seikagauku Corporation, Tokyo, Japán).

3.9.3. Lézer szkenning citometria

Az egyedi sejtek DNS-tartalmát lézer szkenning citométerrel LSC 101 (Olympus, Tokyo, Japán) mértük. A sejteket 70%-os alkoholban fixáltuk. Az RNS-t 0,5 mg/ml RNázzal degradáltuk. A DNS-t 30 μg/ml propídium-jodiddal (PI) festettük. A sejtciklus-analízist a PI fluoreszcencia csúcsok alapján végeztük. A G1 ill. G2 DNS-taralmú sejteket fluoreszcencia-intenzitásuk alapján különítettük el.

4. Eredmények ismertetése és értékelése

4.1. Termelő törzsek felderítése, killer-szenzitív kapcsolatok tisztázása

4.1.1. Antikriptokokkális toxint termelő törzsek felderítése

Biológiai társulásokban az élőlények különböző eszközöket fejlesztettek ki, melyekkel előnyhöz juthatnak az élettér benépesítéséért ill. tápanyagokhoz való hozzájutásért folytatott kompetíció során. Ilyen eszközök lehetnek a gombák specifikus ill. nem specifikus hatású extracelluláris termékei. Előbbiek közé tartoznak az általában a termelő törzzsel közeli rokonságban álló gombákat pusztító killer toxinok. Ismert néhány élesztő, melyről már korábban leírták, hogy képes humán patogén élesztők ellen hatásos toxin termelésére (Polonelli *et al.*, 1986). Munkánk során ilyen, elsősorban az egyre nagyobb klinikai jelentősséggel bíró *C. neoformans* ellen hatásos anyagot termelő törzseket kerestünk.

A Szegedi Egyetem Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (SZMC) megtalálható élesztőket (Függelék 9.1) teszteltük, hogy képesek-e antikriptokokkális toxin termelésére. A megvizsgált 220 törzs egyike sem gátolta a *C. neoformans* IFM 5844 törzsét, kivéve a *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078-at, melynek toxintermelő képességét korábban is megfigyelték (Golubev *et al.*, 1991).

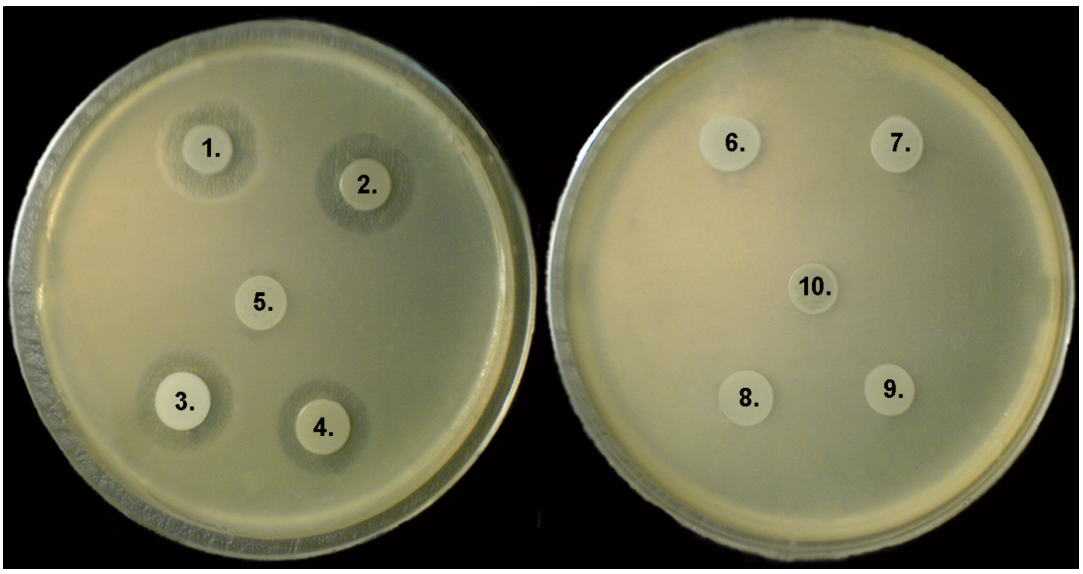
Ismert, hogy egy faj nem minden törzse rendelkezik killer fenopítussal, ill. a toxint termelő törzsek sem mindig ugyanazt a toxint termelik (*C. laurentii, Pichia membranifaciens, Rhodotorula mucilaginosa, S. cerevisiae*) (Schmitt & Breinig, 2002). Mindemellett nem készült még olyan tanulmány, mely az egy fajba tartozó, toxint termelő ill. nem termelő törzseket és ezek toxinjait hasonlítaná össze. A dolgozat célja ezért *Filobasidium capsuligenum* törzsek tesztelése toxintermelésre nézve, majd a killer, ill. non-killer fenotípusú törzsek összehasonlítása, a termelt toxinok azonosságának ill. különbözőségének megállapítása valamint e toxinok pontosabb megismerése. Mindehhez további *F. capsuligenum* izolátumokra volt szükségünk, melyeket különböző nemzetközi törzsgyűjteményekből szereztünk be. Ily módon összesen 10, a világ különböző földrajzi területeiről, európai országokon kívül Dél-Amerikából ill. Japánból származó tözset gyűjtöttünk össze, melyeket eltérő környezetből, (talajból, növényekből valamint

fermentációs eljárásokból) izoláltak. Ezek törzsszámát, származásuk helyét, izolálásuk forrását és az izolálásukat végző személyek nevét az 4-1.-es táblázatban foglaltuk össze.

Törzsszám	Izolálás helye	Izolálás forrása	Izoláló
IFM 40078 (CBS4736)	Dél-Afrika	Borpince	Van der Walt, J. P.
NCAIM Y-01177	Törökország	Szárított füge	Péter, G.
NCAIM Y-01226	Törökország	Szárított füge	Péter, G.
VKM Y-1513 (CBS 1906)	Japán	Sake moto	Dikkens és Lodder
VKM Y-2623 (CBS 4381)	Anglia	Almabor	Beech, F.W.
NCAIM Y-00469	Ismeretlen	Ismeretlen	Deák, T.
NCAIM Y-00472	Ismeretlen	Ismeretlen	Deák, T.
CBS 6122	Németország	Talaj	Kraepelin, G.
CBS 4173	Németország	Szőlőlé	Friedrich, E.
CBS 6219	Olaszország	Ismeretlen	Fernandez, A.

4-1. táblázat: A munkánk során vizsgált *Filobasidium capsuligenum* törzsek eredete.

Az izolátumokat agardiffúziós tesztben vizsgáltuk, hogy képesek-e a *C. neoformans* IFM5844 törzsének növekedését gátolni. Kísérleteink azt mutatták, hogy a tíz törzs közül négy (IFM 40078, NCAIM Y-01177, NCAIM Y-01226 és CBS 6219) képes volt antikriptokokkális toxin termelésére (k^+), míg a többi hat nem mutatott killer-fenotípust (k^-) (4-1. ábra).



4-1. ábra: *Filobasidium capsuligenum* törzsek gátló hatása *Cryptococcus neoformans* IFM5844 törzsének növekedésére. **1.** NCAIM Y-01177, **2.** IFM 40078, **3.** NCAIM Y-01226, **4.** CBS 6219, **5.** VKM 2623, **6.** NCAIM Y-0469, **7.** CBS 4173, **8.** NCAIM Y-00472, **9.** CBS 6122, **10.** VKM1513.

4.1.2. *F. capsuligenum* törzsek egymásra gyakorolt hatása (kereszt-reakciók)

Killer-szenzitív kapcsolatok tisztázása érdekében teszteltük, hogy *F. capsuligenum* törzsek egymás ellen termelnek-e toxint, illetve érzékenyek-e egymás toxinjaira. Eredményeink azt mutatták, hogy az antikriptokokkális toxint nem termelő vonalak *F. capsuligenum* törzsek ellen sem voltak hatásosak. Mindemellett mindannyian érzékenynek bizonyultak a killer fenotípusú törzsek toxinjaira (4-2. ábra). Neutrális (sem termelő, sem érzékeny) fenotípust egyik izolátum sem mutatott.

4-2. ábra: Nem termelő törzsek érzékenysége termelő törzsek toxinjára. A killer törzsek telepeit számok jelölik: **1.** NCAIM Y-01177, **2.** IFM 40078, **3.** NCAIM Y-01226, **4**. CBS 621

4.1.3. Következtetések

Vizsgálataink során számos élesztőtörzset teszteltünk antikriptokokkális toxin termelésére nézve, és csak egy *F. capsuligenum* törzs esetében kaptunk pozitív eredményt. Mindez jelezheti az adott törzs egyediségét, ám a toxintermelés képességének elvesztése egyes izolátumoknál lehet a laboratóriumban való fenntartás következménye is, különösen extrakromoszómális elemeken kódolt toxinok esetében, mivel ezek az elemek a folyamatos átoltások során könnyen elvesznek. Killer fenotípus ritkább előfordulását labortörzseknél számos esetben megfigyelték (Buzzini *et al.*, 2007). Mindemellett, mivel a killer toxinok általában rokon törzsekre hatnak (Heard & Fleet, 1987), és a gyűjteményben kevés *C. neoformans*-szal rokon törzs található, ez szintén magyarázhatja a toxintermelő törzsek hiányát.

További *F. capsuligenum* törzsek vizsgálatakor kiderült, hogy a faj izolátumainak viszonylag nagy hányada (40%) rendelkezik a toxintermelés képességével. A neutrális törzsek hiánya azt jelzi, hogy nem alakultak ki olyan vonalak, melyek elvesztették toxintermelő képességüket, de immunitásuk megmaradt. Ez utalhat arra, hogy a toxin kromoszómálisan kódolt, mivel az extrakromoszómális elemek könnyebben elvesznek, mint a nukleáris genom részei.

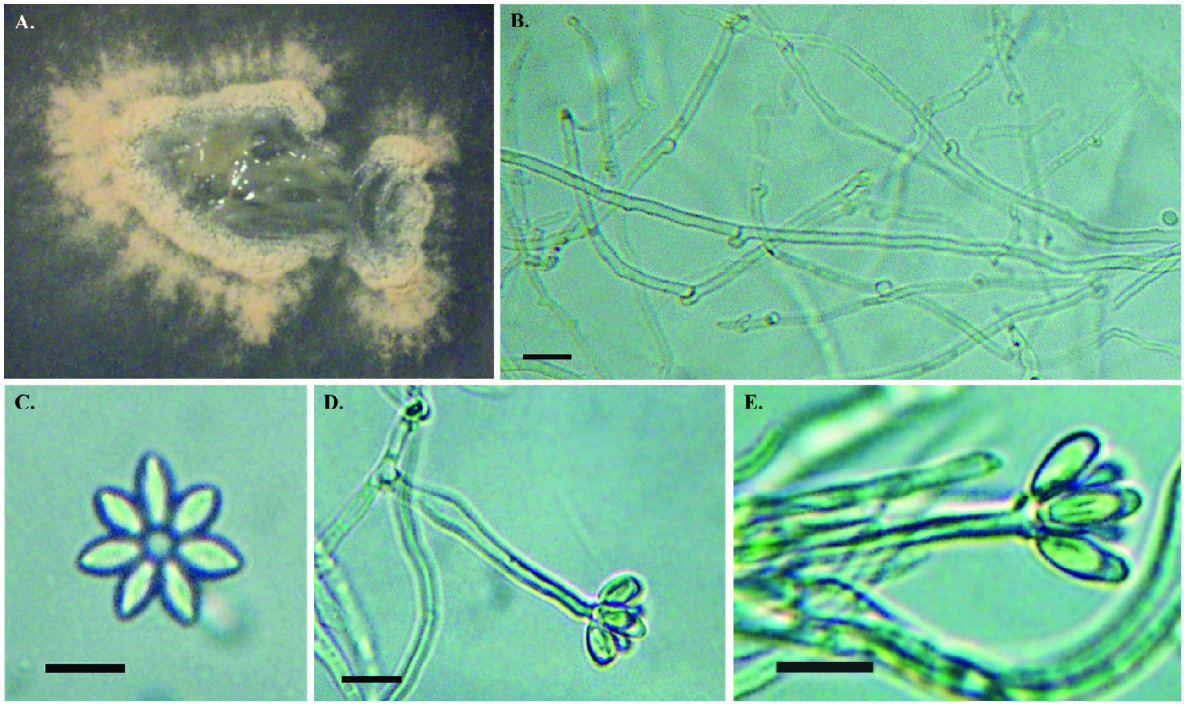
4.2. Killer és non-killer fenotípusú *F. capsuligenum* törzsek jellemzése, filogenetikai kapcsolatuk elemzése

Miután megállapítást nyert, hogy killer fenotípusuk alapján két, jól elkülöníthető, termelő ill. érzékeny csoportra osztható az általunk vizsgált 10 törzs, megvizsgáltuk, hogy milyen kapcsolatban állnak egymással, ill. elkülöníthetők-e más tulajdonságaik alapján is.

4.2.1. Mating-típusuk meghatározása

A *Filobasidium capsuligenum* heterotallikus faj, két ellentétes, **a** és α párosodási típussal rendelkezik. Megvizsgáltuk, hogy izolátumaink képesek-e párosodni egymással, ill. mely párosodási típussal rendelkeznek. A vizsgálat célja egyrészt az volt, hogy megállapítsuk, milyen szoros kapcsolatban vannak egymással, a klasszikus biológiai fajfogalom szerint egy fajba tartoznak-e, másrészt mivel a párosodási típust már korábban összefüggésbe hozták a toxin termeléssel, ill. érzékenységgel (Klassen *et al.*, 2006), szerettük volna megtudni, hogy esetünkben fennáll-e hasonló kapcsolat. Kukoricaliszt-agaron a különböző párosodási típushoz tartozó sejtek konjugálnak, majd dikariotikus hifákat képeznek (Thornton, 1986). A leoltást követő pár héten belül ezek a fonalak láthatóvá válnak (4-3. ábra). Az IFM 40078 törzsről ismert, hogy α, míg a VKM Y-1513-ról, hogy **a** párosodási típusú, így ezeket típustörzsként felhasználva meghatározhattuk, mely párosodási típusba tartozik a többi törzs.

Kísérleteink azt mutatták, hogy a toxintermelő törzsek mindegyike képes volt a nem termelő VKM Y-1513, VKM Y-2623 és NCAIM Y-0469 törzsekkel konjugálni, azonban a NCAIM Y-0472 törzzsel nem párosodott (4-2. táblázat). Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy minden általunk vizsgált termelő törzs α párosodási típusú, mely felveti annak a lehetőségét, hogy a *F. capsuligenum* toxin termelő képessége az α párosodási típushoz kapcsolt.



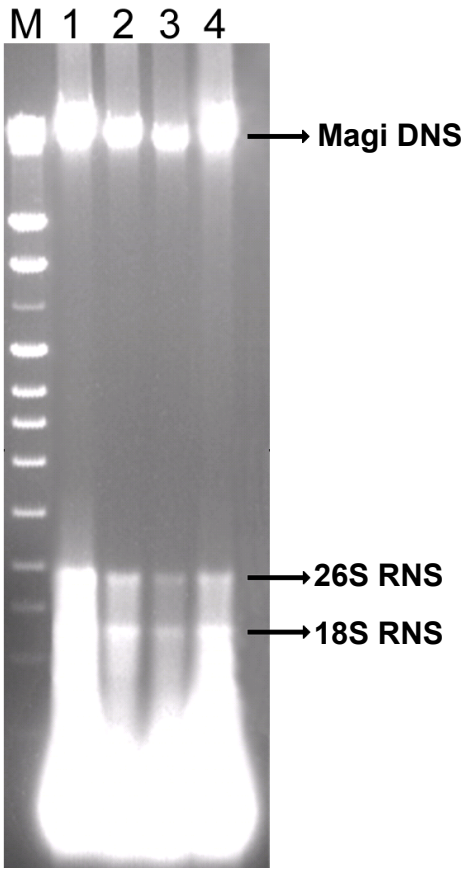
4-3. ábra: *Filobasidium capsuligenum* párosodása. **A.: a** és α törzsek konjugációját követő hifaképzés kukoricás táptalajon. **B.:** Fonalas növekedés és csatképzés fénymikroszkópos képe. **C-E.:** Bazídiumok és bazidiospórák. A jel 10 µm-nek felel meg.

Killer fenotípus	Törzsek	Párosodási típus
k^+	IFM 40078	α
	NCAIM Y-01177	α
	NCAIM Y-01226	α
	CBS 6219	α
k^-	VKM Y-1513	**a**
	VKM Y-2623	**a**
	NCAIM Y-00469	**a**
	NCAIM Y-00472	α
	CBS 4173	**a**
	CBS 6122	**a**/α

4-2. táblázat: *Filobasidium capsuligenum* törzsek párosodási valamint killer fenotípusának eloszlása.

4.2.2. Extrakromoszómális elemek jelenlétének vizsgálata

Annak eldöntésére, hogy a toxin termelésért felelős gént ill. géneket extrakromoszómális elemek kódolják-e, vagy a termelő és nem termelő törzsek közti különbség a magi DNS szintjén valósul-e meg, killer fenotípusú törzsek teljes nukleinsav-kivonatát gélelektroforézissel elválasztottuk. A magi DNS-nek ill. a két riboszómális alegység rRNS-einek megfelelő sávokon kívül nem különült el egyéb olyan elem, mely DNS plazmid, vagy RNS vírus jelenlére utalna (4-4. ábra). Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a toxinok kromoszómálisan kódoltak.



4-4. ábra: Toxintermelő törzsek teljes nukleinsav-kivonatának gélelektroforézise. A nyilak a magi DNS-nek, ill a kis és nagy riboszómális rRNS-eknek megfelelő sávokat jelölik. **M:** λ-Puc mix marker, **1.** IFM 40078, **2.** NCAIM Y-01177, **3.** NCAIM Y-01226, **4.** CBS 6219.

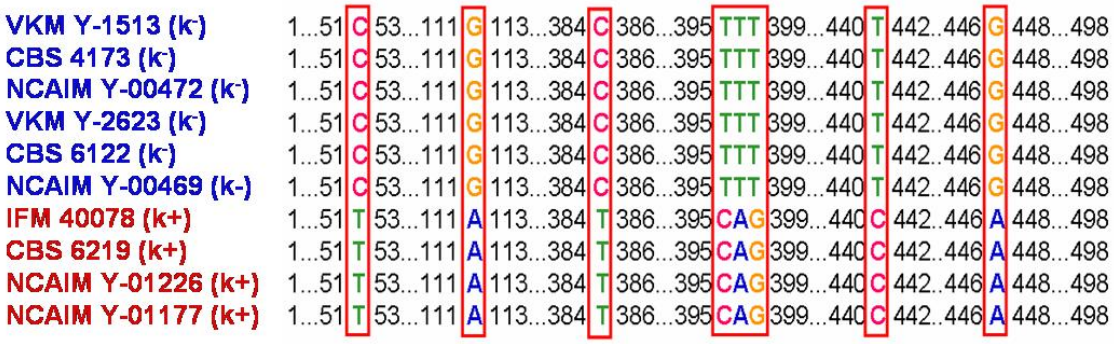
4.2.3. rRNS-eket kódoló DNS szekvenciák összehasonlítása

Mivel a toxin valószínűleg kromoszómálisan kódolt, felvetődött a lehetőség, hogy a termelő ill. nem termelő törzsek magi génállománya egyéb területeken is eltér, ezért először összehasonlítottuk azok riboszómális D1/D2-régióit, ill. ITS-szakaszait. A szekvenciákhoz tartozó GenBank-i azonosító számokat a 4-3. táblázatban tüntettük fel.

Törzsek	**GenBank-i azonosító számok**	
	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	**D1/D2 régió**
IFM 40078 (CBS4736)	AF444369	AF075501
NCAIM Y-01177	EF532829	EF532833
NCAIM Y-01226	EF532830	EF532834
CBS 6219	AF444334	AF181506
VKM Y-1513 (CBS1906)	AF444381	AF363642
VKM Y-2623 (CBS4381)	AF444382	AF444695
NCAIM Y-00469	EF532831	EF532835
NCAIM Y-00472	EF532832	EF532836
CBS 4173	EF611232	EF611233
CBS 6122	EF611231	EF611234

4-3. táblázat: *Filobasidium capsuligenum* törzsek rDNS szekvenciáinak GenBank-i azonosító számai.

A D1/D2-régió 498, ill. az ITS-régió 490 nukleotid hosszúságú szakaszát vontuk be filogenetikai elemzésünkbe. A termelő ill. nem termelő törzsek D1/D2-szakaszai megegyeztek egymással, míg a két csoport között jelentős eltérés mutatkozott, a 490 nukleotid közül 8 helyen tértek el egymástól. Mindez 1,61 %-os divergenciát jelent (4-5. ábra). Kospecifikus törzsek általában csak 0-1 %-ban különböznek D1/D2-régiójukban (Peterson & Kurtzman, 1991).



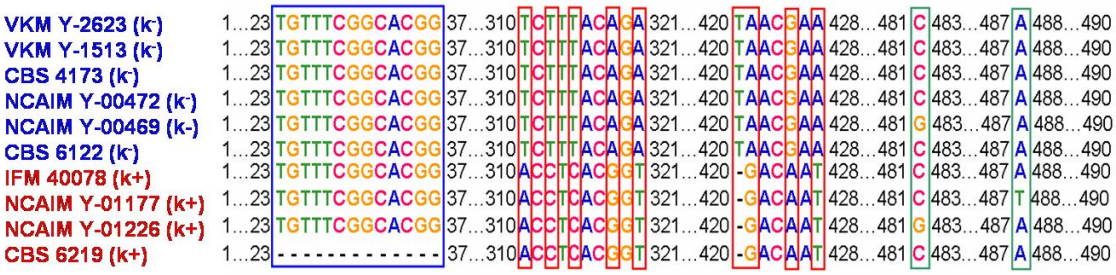
4-5. ábra: *Filobasidium capsuligenum* D1/D2 szekvenciáinak összehasonlítása. A két csoport közti különbségeket piros keretek jelzik.

Az ITS-régiók elemzésekor azt tapasztaltuk, hogy a killer fenotípusú CBS 6219-es törzs 13 nukleotidban eltér a többi termelő törzstől. Ez a különbség azonban inkább tulajdonítható egy deléció következményének, mint egyedi szubsztitúcióknak, így ez filogenetikai szempontból kisebb jelentősségű. Ezt szem előtt tartva ezeket a nukleinsav-eltéréseket nem vettük figyelembe elemzésünk során.

Mindemellett, az NCAIM Y-01177 (k^+), a VKM Y-1513 (k^-) és a NCAIM Y-01226 (k^+) törzsek egy nukleotidban tértek el saját csoportjuk többi tagjától. Utóbbi kettő, bár nem azonos csoportba tartoznak, ugyanazon a helyen ugyanazt a szubsztituenst tartalmazzák. A VKM Y-2623 (k^-) törzs két nukleotidban különbözik a többi nem termelő törzstől. Ezek közül az egyik megegyezik a VKM Y-1513 (k^-), és a NCAIM Y-01226 (k^+) törzsekben is azonos nukleotiddal, míg a másik a NCAIM Y-01177 (k^+) törzs szubsztitúciójával közös.

Összességében a CBS 6219-es törzs 13 nukleotid hosszúságú deléciójától eltekintve a csoportok egyetlen tagja sem különbözik két nukleotidnál többel a csoport

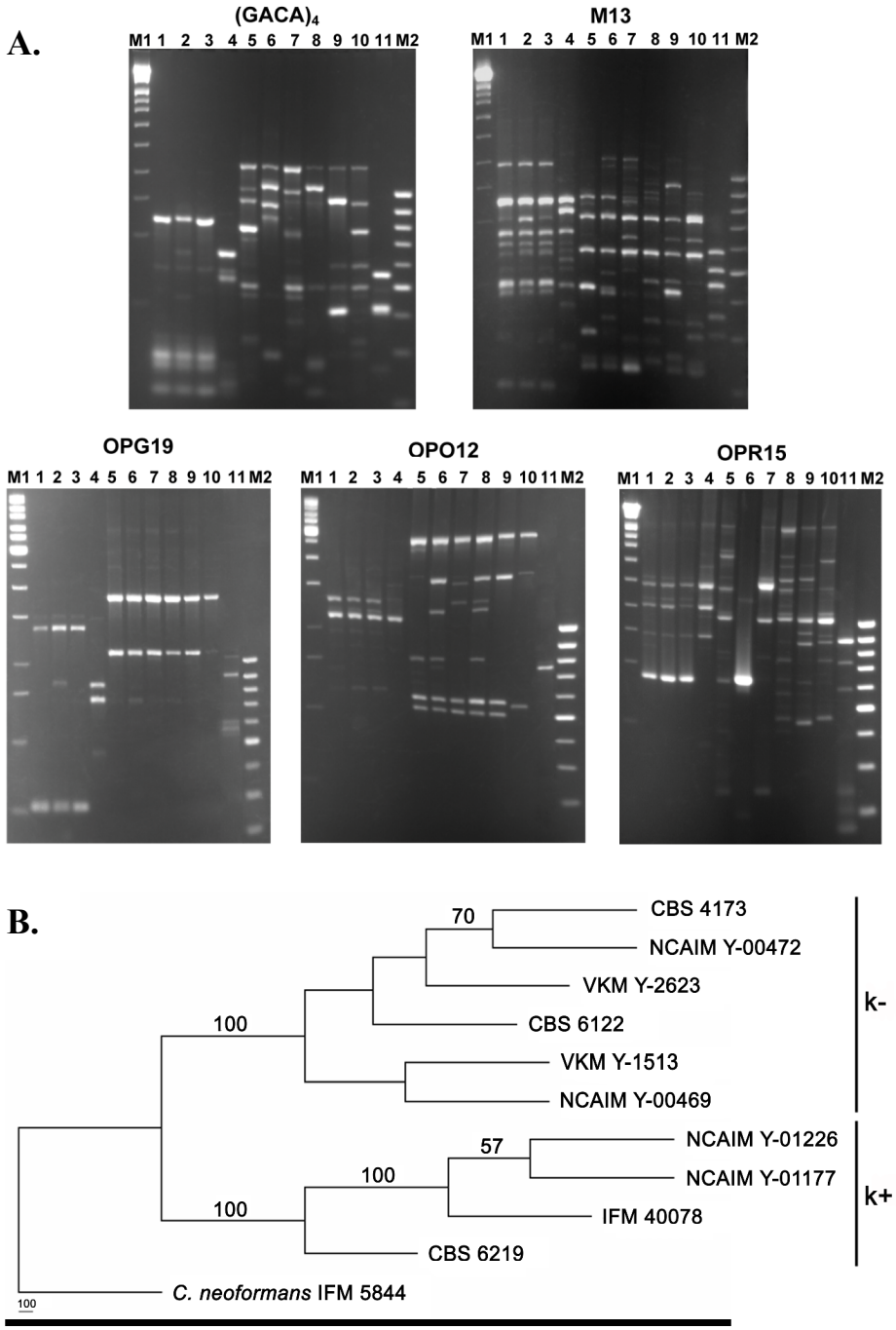
többi tagjától, ami maximum 0,4 %-os divergenciát jelent. Ha azonban a termelőket és a nem termelőket hasonlítjuk össze jelentős különbséget találunk a két csoport között. A CBS 6219 törzs delécióját ismét figyelmen kívül hagyva a két csoport tagjai 9-11 pozícióban különböznek, ami 1,84-2,24 %-os eltérést jelent (4-6. ábra).



4-6 ábra: *Filobasidium capsuligenum* törzsek ITS-régióinak összehasonlítása. A két csoport közti nukleotid-különbségeket piros keretekkel jelöltük. Kék keret jelzik a CBS 6219 törzs 13 bp hosszúságú delécióját, míg a zöldek a killer fenotípustól független, egyedi szubsztitúciókat jelzik.

4.2.4. DNS-fingerprinting és RADP-analízis

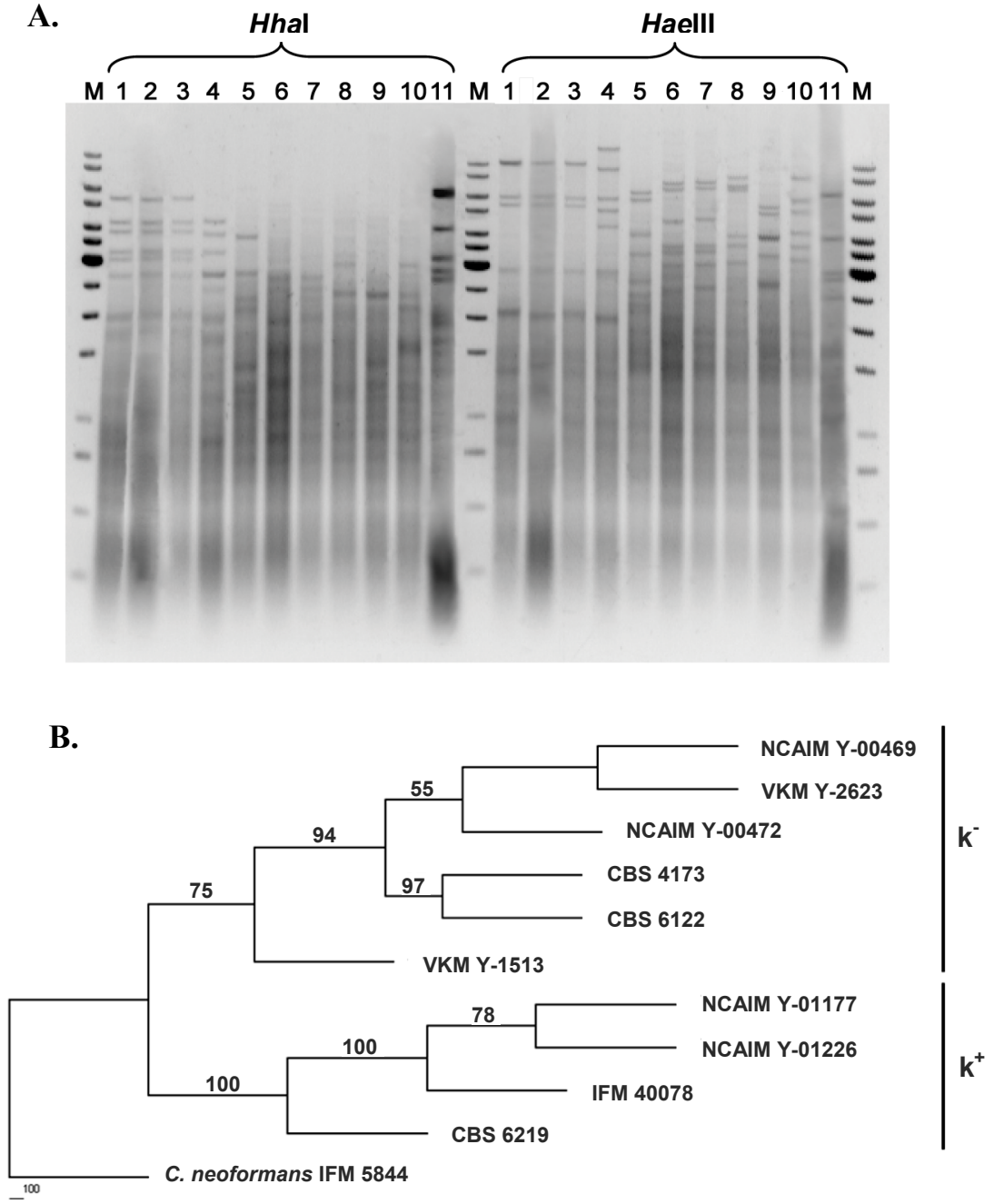
A továbbiakban elvégeztük a teljes DNS-kivonatok RAPD-analízisét M13, $(GACA)_4$ primerek ill. PCR-fingerprinting analízisét OP (OPO12, OPG19, OPR15) primerek felhasználásával. A kapott mintázatok egyértelműen azt mutatták, hogy a killer fenotípusú ill. a nem termelő törzsek jelentősen eltérnek. Míg a termelők közt számos azonos sávot figyelhetünk meg, a nem termelők mintázata kevésbé hasonlított egymáshoz. A kapott mintázatok alapján a *C. neoformans* IFM 5844 törzset külcsoportként (outgroupként) használva Neighbor-joining módszer segítségével fenogramot készítettünk (4-7. ábra). A fán - az ITS- ill. D1/D2-szekvenciaanalízissel kapott eredményekkel egybevágva - magas bootstrap értékekkel, egyértelműen elkülönül a termelő ill. nem termelő törzsek csoportja. A csoportokon belül a tagok viszonya egymáshoz azonban már nem olyan egyértelmű, az itt megfigyelt bootstrap értékek igen alacsonyak.



4-7. ábra: *Filobasidium capsuligenum* törzsek RAPD- ill. PCR-fingerprinting analízise. **A.** Teljes DNS-ek $(GACA)_4$, M13 és három OP primer használatával nyert PCR-fingerprinting ill. RAPD-mintázata. Minták: **M1:** 1000 bp DNA ladder, **M2:** 100 bp DNA ladder **1-4.** Killer törzsek (IFM 40078; NCAIM Y-01177; NCAIM Y-01226; CBS 6219); **5-10.** Non-killer törzsek (VKM1513; VKM2623; NCAIM Y-0469; NCAIM Y-0472; CBS 4713; CBS 6122); **11.** *Cryptococcus neoformans* IFM5844. **B.** PCR-fingerprinting ill. RAPD-mintázat adatai alapján, Neighbor-joining analízis segítségével generált fenogram. Az elágazások feletti számok bootstrap értékeket jelölnek százalékban, 1000 ismétlésből. Csak az 50%-nál nagyobb értékeket tüntettük fel.

4.2.5. mDNS-RFLP analízis

Annak eldöntésére, hogy a csoportok extrakromoszómális szinten is eltérnek-e, mtDNS-RFLP analízist végeztünk. Ehhez a törzsek teljes nukleinsav-kivonatát emésztettük nagy GC-tartalmú felismerő hellyel rendelkező restrikciós enzimekkel, *Hha*I-gyel, (felismerő hely: GCGC) és *Hae*III-mal (felismerő hely: GGCC). Az így kapott mintázatok megerősítették az eddig kapott eredményeket; a PCR-fingerprinting és RAPD-analízishez hasonlóan itt is jól elkülönült a két csoport, ill. a nem termelő törzsek között itt is kisebb hasonlóság mutatkozott, mint a termelők közt. Az RFLP-vel kapott adatok alapján készített fenogram hasonló topológiát mutat a PCR-fingerprinting és RAPD-mintázat ok alapján készülttel (4-8. ábra). Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a két csoport mitokondriális szinten is jól elkülönülő egységet alkot.



4-8. ábra: *Filobasidium capsuligenum* izolátumok mtDNS-RFLP analízise. **A.** A törzsek *Hae*III ill. *Hha*I enzimek hasításával nyert mtDNS-RFLP mintáza. Minták: **M:**1000 bp DNA ladder, **1-4.** Killer törzsek (IFM 40078; NCAIM Y-01177; NCAIM Y-01226; CBS 6219); **5-10.** Non-killer törzsek (VKM Y-1513; VKM Y-2623; NCAIM Y-00469; NCAIM Y-00472; CBS 4713; CBS 6122) 11. *Cryptococcus neoformans,* IFM5844. **B.** mtDNS-RFLP mintázat adatai alapján, Neighbor-joining analízis segítségével generált fenogram. Az elágazások feletti számok bootstrap értékeket jelölnek százalékban, 1000 ismétlésből. Csak az 50%-nál nagyobb értékeket tüntettük fel.

4.2.6. Következtetések

Munkánk során a termelő és nem termelő *F. capsuligenum* törzsek közti kapcsolatok tisztázása érdekében először meghatároztuk párosodási típusukat. A termelő törzsek a NCAIM Y-0472 jelű törzs kivételével minden nem termelő törzzsel képesek voltak konjugálni és hifákat képezni. Mivel a nem termelő VKM1513 törzsről ismert, hogy **a** mating típusú, a termelők mindegyike α párosodási típussal rendelkezik. Ez a megfigyelés utalhat arra, hogy a toxin termelése α mating típushoz kötött.

Annak megállapítására, hogy a termelők és nem-termelők közti különbség a magi genomban keresendő, vagy RNS-vírusok ill. DNS-plazmidok felelősek a toxin termelésért, megvizsgáltuk, hogy a termelő törzsek tartalmaznak-e ilyen extra-kromoszómális elemeket. Teljes nukleinsav kivonatok elválasztása során a magi DNS-en és a riboszómális RNS-eken kívül nem jelent meg egyéb sáv, így a toxin termelése valószínűleg kromoszómálisan kódolt.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy e két csoport genomja más régiókban is eltér-e. Ennek eldöntésére ITS ill. D1/D2 rDNS-régiókból származó szekvenciákat vizsgáltunk, valamint PCR-fingerprinting ill. RAPD-analízist végeztünk. A két csoport tagjai egymáshoz képest csak minimálisan (0,4%-ban) tértek el egymástól ITS-szekvenciájuk alapján, a D1/D2-régiót tekintve pedig teljesen megegyeztek. A két csoport között azonban igen nagy eltérés (1,6-2,24%) mutatkozott az rDNS-régiókban. Az egy fajba tartozó izolátumok általában ennél kisebb mértékben (0-1%) térnek el egymástól D1/D2-szekvenciájukban (Peterson & Kurtzman, 1991). A PCR-fingerprinting és RAPD-mintázatok alapján készített fenogram topológiája szintén megerősítette, hogy a termelő és nem termelő csoport különvált az evolúció során.A fenti eredményeket a törzsek mtDNS-RFLP analízisével kapott eredmények is alátámasztották, ami arra utal, hogy a két csoport nem csak magi genomjukban, de extrakromoszómális szinten is eltér.

A termelő ill. nem termelő törzsek nagy mértékű elkülönülése felveti annak a lehetőségét, hogy a *F. capsuligenum* faj két varietasra oszlik.

4.3. Termelő törzsek toxinjainak jellemzése, összehasonlítása

Az előzőekben láttuk, hogy a *F. capsuligenum* törzsek toxintermeléséért valószínűleg magi gének tehetők felelőssé. Kísérleteink következő szakaszában arra szerettünk volna választ kapni, hogy ezek a gének vajon azonos, vagy eltérő toxinok expresszióját biztosítják-e.

4.3.1. Hatásspektrum-vizsgálat

Egy-egy toxin specificitása, hatásspektruma – amellett, hogy igen sokféle lehet – meghatározó tulajdonsága az adott toxinnak. Épp ezért megvizsgáltuk, hogy a négy termelő *F. capsuligenum* törzs ugyanazokra az izolátumokra van-e hatással, vagy eltérő hatásspektrummal rendelkezik.

4.3.1.1. Hatásuk C. neoformans törzsekre

Először törzsgyűjteményből származó *C. neoformans* törzsekre teszteltük a toxinok hatékonyságát. A 25 törzs között megtalálható volt mind az öt szerotípus (A, B, C, D és AD) és nyolc molekuláris szubtípus (VN I-IV és VG I-IV), valamint egyaránt tartalmazott klinikai és környezeti mintából származó izolátumokat. Vizsgálatunkba bevontunk néhány általunk izolált *C. neoformans* törzset is (lásd. 4.4.1.1 fejezet). A vizsgált törzsek törzsszámát, varietasukat, szero- és molekuláris szubtípusukat, valamint izolálásuk forrását a 4-4. táblázatban tüntettük fel. A törzsek közül csak egy – a WM 161 – nem mutatott érzékenységet a termelő törzsek toxinjaira.

	Varietas	Szerotípus	Molekuláris szubtípus	Forrás
IFM 5844	*var. neoformans*	D		NIH B-3501
IFM 5845	*var. neoformans*	D		NIH B-3502
IFM 48637	*var. neoformans*	D		CBS 132
IFO 410	*var. grubii*	A		Betegből
WM 148	*var. grubii*	A	VN I	Sydney, betegből
WM 626	*var. grubii*	A	VN II	Sydney, betegből
WM 628	*var. hybrid*	A/D	VN III	Melbourne, betegből
WM 629	*var. neoformans*	D	VN IV	Melbourne, betegből
WM 179	*var. gattii*	B	VG I	Ausztrália, betegből
WM 178	*var. gattii*	B	VG II	Ausztrália, betegből
WM 161	*var. gattii*	B	VG III	Kalifornia, eucalyptus sp.
WM 779	*var. gattii*	C	VG IV	Afrika, állatból
H-23 (IFM 51702)	*var. neoformans*	D		Magyarország, galambürülékből
H-28 (IFM 51706)	*var. grubii*	A		Magyarország, galambürülékből
H-30		C		Magyarország, galambürülékből
H-62 (IFM 51710) 62680A	*var. grubii*	A		Magyarország, betegből
H-63 (IFM 51711) 60279B	*var. grubii*	A		Magyarország, betegből
353/2004				Magyarország, betegből
2679/2003				Magyarország, betegből
2710/2003				Magyarország, betegből
60203A				Magyarország, betegből
60209C				Magyarország, betegből
60467B				Magyarország, betegből
62680A				Magyarország, betegből
62680C				Magyarország, betegből

4-4. táblázat: Vizsgált *Cryptococcus neoformans* törzsek törzsszáma, varietasa, szero- és molekuláris altípusa, valamint izolálásuk forrása

4.3.1.2. Hatásuk egyéb gomba törzsekre

A toxinok specificitásának megismerése érdekében *C. neoformans*-on kívül egyéb, összesen 13 élesztőtörzset is bevontunk a vizsgálatokba, köztük olyan élesztőket is, melyekről antikriptokokkális toxintermelését már korábban leírták (*C. laurentii, Cystofilobasidium bisporidii, C. podzolicus*). További vizsgált törzsek a Függelékben (9.1 fejezet) találhatók, aláhúzással jelölve. Egy általunk izolált *C. albidus* törzset, (H-72) szintén leteszteltünk mind a négy toxinra (4.3.4.1. fejezet és Függelék 9.2.). *Basidiomycota* élesztők közül a *Tremellaceae* családba tartozó két vizsgált *C. laurentii* törzs közül egy, valamint a *C. podzolicus* bizonyult érzékenynek a toxinokra, míg a *Filobasidiaceae*, *Cystofilobasidiaceae* és *Sporidiobolaceae* vizsgált tagjai (*C. albidus, Cystofilobasidium bisporidii* és *Rhodotorula mucilaginosa*) ellenálltak a toxinok hatásának.

4.3.2. Toxinok biokémiai természetének meghatározása

4.3.2.1. Termeltetés optimális körülményeinek meghatározása

Mivel irodalmi adatokból ismert, hogy a toxinok igen kis mennyiségben, általában 0,001-2 μg/ml koncentrációban szekretálódnak a fermentlébe (Sawant *et al.*, 1989; Buzzini *et al.*, 2004), további vizsgálatuk előtt meghatároztuk a termelődéshez szükséges optimális feltételeket.

A termelő törzsek szelekcióját 4-es pH-n és 20 °C-on végeztük, és a termeléshez is ez bizonyult a legmegfelelőbbnek. Optimális toxintermelés eléréséhez különböző összetételű minimál és komplett tápoldatokban növesztettünk *F. capsuligenum* sejteket. A toxin csak komplett tápoldatban (2xYD4, 2xYPD4, YM4) való tenyésztéskor termelődött, szintetikus minimál tápoldatban nem. Biotesztben detektálható mennyiségű toxint csak akkor kaptunk, ha a sejtszám elérte a 10^7 /ml koncentrációt (4-5. táblázat). A legnagyobb mennyiséget YM4 tápoldatban nyertük, 48 óra inkubálás után 10^8 sejt/ml koncentrációnál, mikor a tenyészet már stacioner fázisba jutott. További tenyésztés után a toxinaktivitás megszűnt. 2xYPD tápoldatban némileg kisebb mennyiségű toxint kaptunk. Ez tovább redukálódott, ha a tápoldat csökkenő arányban, vagy egyáltalán nem tartalmazott peptont. A toxin tisztítása valószínűleg szintetikus VMM4 táloldatból egyszerűbb lenne, mint a sok, nagytömegű fehérjemolekulát is tartalmazó komplett tápoldatokból, ezért megkíséreltük a termeltetést olyan VMM4-ben, amely a 20-féle aminosavat 50 μg/ml koncentrációban tartalmazta. A toxin termelődését 14 napon át követtük, de ez idő alatt sem kaptunk pozitív eredményt.

Más kísérletben a minimál tápoldathoz a *C. neoformans* hővel elölt sejtjeit adtuk 2%-os mennyiségben kénforrásként, azonban a célsejtek jelenléte sem tudta a toxintermelődést indukálni.

Tenyésztési idő (nap)	Tápoldat					
	2xYD		2xYPD		YM	
	Sejtszám/ ml	Toxin-termelés (aktivitás mm-ben)	Sejtszám/ ml	Toxin-termelés (aktivitás mm-ben)	Növekedés (sejtszám/ml)	Toxin-termelés (aktivitás mm-ben)
0	$1{,}0x10^5$	0	$1{,}0x10^5$	0	$1{,}0x10^5$	0
1	$>1{,}0x10^6$	0	$2{,}3x10^6$	0	$1{,}0x10^7$	16,5
2	$5{,}20x10^6$	0	$2{,}4x10^8$	23,0	$4{,}4x10^8$	24,5
3	$1{,}6x10^7$	17,0	$4{,}3x10^8$	22,0	$6{,}5x10^8$	24,0
4	$2{,}1x10^8$	20,0	$4{,}8x10^8$	21,0	$6{,}2x10^8$	22,0
5	$4{,}8x10^8$	21,0	$5{,}9x10^8$	0	$7{,}1x10^8$	0

4-5. táblázat: *Filobasidium capsuligenum* növekedési és toxintermelési kinetikája komplett tápoldatokban tenyésztve. A toxintermelés mértékének meghatározásához 1 cm-es lyukakba pipettázott 150 µl fermentlé gátlási zónáját mértük *Cryptococcus neoformans* IFM 5844 törzsével szemben.

4.3.2.2. Toxinok biokémiai tulajdonságának vizsgálata

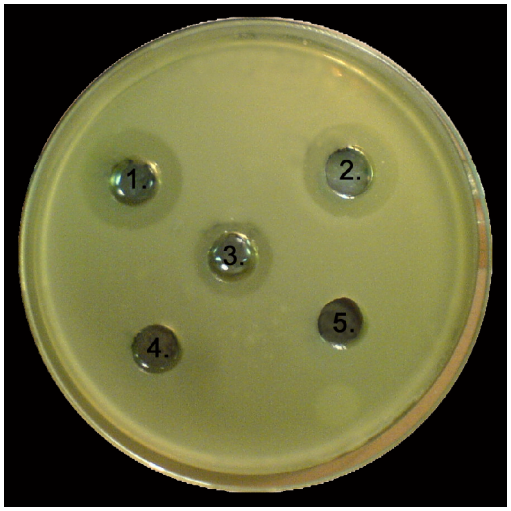
A gombák által termelt ismert antifungális hatású ágensek lehetnek fehérjetermészetűek, kis molekulasúlyú peptidek, glikopedtidek vagy glikolipidek. A toxinok biokémiai vizsgálataival szerettünk volna képet kapni arról, hogy a négy törzs által termelt toxinok azonos kategóriába sorolhatók-e.

4.3.2.2.1. Toxinok aktivitásának hőmérséklet- és pH-optimuma

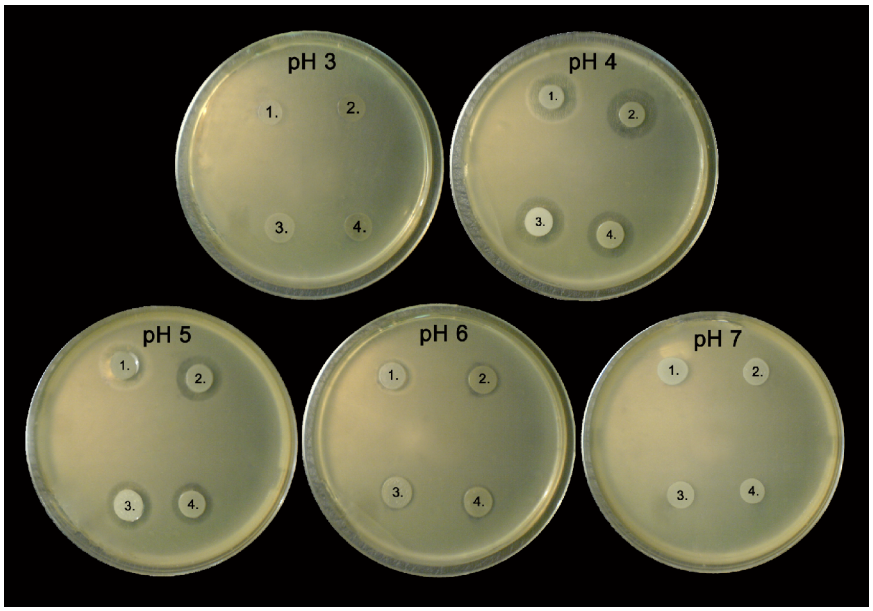
A toxin hőstabilitásának vizsgálatához *F. capsuligenum* fermentlevét különböző hőmérsékleten (20 °C, 25°C, 30°C, 37°C, 40 °C) egy éjszakán át inkubáltuk, majd aktivitását lyuktesztben vizsgáltuk. Az 4-9. ábrán példaként az IFM 40078 törzs fermentlevének aktivitásváltozása látható különböző hőmérsékleten történt inkubálást követően. A korábban leírt toxinokhoz hasonlóan a *F. capsuligenum* törzsek toxinjai is igen hőérzékenyeknek bizonyultak, 30 °C feletti hőmérsékleten egy éjsyakán át inkubálva, ill. 1 percig forralva teljesen elvesztették aktivitásukat.

Mivel a legtöbb ismert toxin csupán viszonylag szűk, savas pH-tartományban aktív (Woods & Bevan, 1968; Young & Yagiu, 1978; Middelbeek *et al.*, 1979), megvizsgáltuk, hogy a *F. capsuligenum* törzsek toxinjainak pH-optimuma mennyiben felel meg ennek a megfigyelésnek. Eredményeink azt mutatják, hogy e toxin is viszonylag szűk, pH 4-6 közötti tartományban aktív (4-10. ábra). Ennek magyarázata

lehet a toxin konformáció-változása a neutrális ill. lúgos környezetben. Ez a reakció valószínűleg irreverzibilis, 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.



4-9. ábra: *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzs toxinjának aktivitása *Cryptococcus neoformans* IFM5844 ellen lyuktesztben különböző hőmérsékleten történt inkubálás után. **1.** 20 °C, **2.** 25 °C, **3.** 30 °C, **4.** 37 °C, **5.** 40 °C



4-10. ábra: Killer toxinok aktivitása különböző pH értékeken **1.** NCAIM Y-01177, **2.** IFM 40078, **3.** NCAIM Y-01226, **4.** CBS 6219.

4.3.2.2.2. Proteáz kezelés hatása toxinok aktivitásra

A hatásspektrum-vizsgálataink során tapasztalt nagyfokú specificitás és hőérzékenység a toxinok fehérjetermészetére utal. Ennek tisztázása érdekében különböző proteináz enzimekkel inkubálva vizsgáltuk, hogy csökken-e a toxin aktivitása. Bár az FC-1 toxin viszonylag ellenállónak bizonyult proteináz K-, pepszin-, ill. papainkezeléssel szemben, pronáz E hatására teljes aktivitáscsökkenést tapasztaltunk, mely alátámasztja a *F. capsuligenum* toxinok fehérjetermészetét. Az 4-11. ábrán az IFM 40078 törzs fermentlevének proteinázkezelést követő maradék aktivitása látható. A többi három törzs esetében is hasonló eredményt kaptunk.

4-11. ábra: Toxinaktivitás különböző proteinázkezelések után *Cryptococcus neoformans* IFM 5488 ellen. **1.** pronáz E, **2.** proteináz K, **3.** kezeletlen kontroll, **4.** papain, **5.** pepszin

4.3.3. Következtetések

A különböző törzsek által termelt toxinok összehasonítása során azt tapasztaltuk, hogy mind hatásspektrumukban, mind biokémiai tulajdonságaikban megegyeztek. Mind a négy törzs hatásos volt a *Cryptococcus neoformans* törzsekre, függetlenül azok szero- és molekuláris típusától, valamint izolálásuk helyétől. Ez alól csak egy törzs, a WM 161 jelentett kivételt, melyre egyik toxin sem volt hatással. Rezisztenciája eredhet a sejtfal ill. membrán receptorában bekövetkezett változásból. Mivel azonban a toxin pontos hatásmechanizmusa még nem ismert, más faktorok eltérése is okozhatja az érzékenység hiányát. További élesztők vizsgálatakor is megegyezett a négy toxin hatásspektruma, így ez alapján ezeket elkülöníteni nem tudtuk.

Különböző tápoldatokban növesztve a toxinokat azt tapasztaltuk, hogy csak komplett tápoldat volt alkalmas aktív toxin termeltetésére. Hasonló jelenséget más toxin, például a *Pichia anomala* K5 típusú toxinja esetében is tapasztaltak korábban (Izgu & Altinbay, 2004). A jelenséget az élesztőkivonatban megtalálható β-D-glükánok hiányával magyarázták, melyek indukálhatják a toxin termelődését. Esetünkben valószínűleg más mechanizmusok játszanak szerepet, mivel élesztőkivonat jelenlétében, de pepton hiányában sem termelődött toxin, sőt, elölt célsejtek sejtmaradványai sem indukálták a toxintermelést. A VMM tápoldat a 21 eszenciális aminosavval kiegészítve sem bizonyult megfelelőnek, így az, hogy a komplett tápoldatok mely komponense szükséges aktív toxintermeléséhez, nyitott kérdés maradt. 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 egyrészt lehet a tápoldat pH-jának eltolódása semleges ill. lúgos irányba, másrészt az öregedő sejtek erősödő proteáztermelése. Mindkét folyamat a toxin inaktiválódásához ill. degradálódásához vezet.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a toxinok biokémiai természetükben is megegyeztek, mind hőmérséklet- és pH-optimumukat, mind proteáz-érzékenységüket

tekintve. A toxinok 30 °C felett inaktiválódnak, és hatásukat csak szűk, savas pH-n fejtik ki. Ennél magasabb pH a toxinokat irreverzibilisen inaktiválja, mivel a pH visszaállításával sem nyerik vissza hatásosságukat. Így, bár más toxinok esetén feltételezték, hogy az alacsony pH az érzékeny sejtek falához való kötődéskor játszik szerepet (Golubev, 2006), esetünkben valószínűleg ettől független hatás miatt nem képesek az érzékeny sejtek pusztítására.

A toxinok proteintermészetének igazolására különböző proteináz enzimekkel kezeltük a toxint tartalmazó fermentleveket, és pronáz E kezelés esetén jelentős aktivitáscsökkenést tapasztaltunk, mely megerősítette azt a felvetést, hogy a toxin valamilyen protein, vagy glikoprotein. A többi proteináz enzim hatástalanságát okozhatja felismerő helyük hiánya a toxin fehérjeszekvenciájában, de valószínűleg szerepe lehetett annak is, hogy ezek az enzimek nem maximális hatékonysággal működnek savas pH-n.

Mindezek alapján, mivel több megközelítést alkalmazva sem tudtuk elkülöníteni őket, megállapíthatjuk, hogy a négy törzs által termelt toxin igen hasonló, valószínűleg azonos.

4.4. Az IFM 40078 törzs által termelt FC-1 toxin jellemzése

4.4.1. Az FC-1 toxin hatásspektruma

Az FC-1 toxin pontosabb jellemzéséhez először részletesebben megvizsgáltuk, hogy mely törzsekre hat, és mennyire szűk specificitással rendelkezik.

4.4.1.1. Cryptococcus törzsek izolálása környezeti és klinikai mintákból

Mivel a korábbiakban láttuk, hogy a toxin elsősorban *Cryptococcus* fajokra hat, és mivel törzsgyűjteményünk kevés, elsősorban klinikai mintákból származó izolátumot tartalmazott, munkánk során környezeti mintákból elsősorban galamb ürülékből izoláltunk *Cryptococcus* törzseket. Emellett kórházakból kapott klinikai mintákat is azonosítottunk. Mivel a *C. neoformans*-ról ismert, hogy fenol származékok jelenlétében képes melanin termelésére, a mintákat napraforgós táptalajon szelektáltuk. Az itt barnuló telepek melanin képzését L-DOPA táptalajon megerősítettük. Vizsgáltuk az izolátumok tokképzését, erjesztését, 37 °C-on való növekedésüket, valamint párosodási képességüket *C. neoformans* referencia törzsekkel. Az így *Cryptococcus*nak bizonyult törzseket szerotipizálásnak vetettük alá. 16 izolátumról kiderült, hogy a *C. albidus* fajba tartozik, bár szerotípusuk alapján az A ill. AD csoportba tartozónak mutatkoztak. Egyértelműen a *C. neoformans* fajba tartozónak bizonyult 20 izolátum (hét A szerotípusú és tizenhároms D). További törzsek közt nyolc A és nyolc 8 C szerotípusút találtunk. Nyolc, betegből izolált minta szerotípusát még nem sikerült meghatározni. A *C. neoformans* fajba sorolt izolátumok mindegyike – egy kivétellel – képes volt párosodni valamely referencia törzzsel. Egy **a** párosodási típusú és egy önsporuláló törzs kivételével valamennyi az α párosodási típusnak feleltek meg, összhangban az irodalomból ismert ténnyel, miszerint a természetben az α párosodási típus jóval gyakoribb, mint az **a** (Wickes & Kwon-Chung, 2002). A *C. albidus* faj képviselői, továbbá hét A szerotípusú izolátum nem volt képes párosodni (Függelék 9.2.).

4.4.1.2. Az FC-1 toxin hatása Cryptococcus izolátumokra

A toxin az egyértelműen *C. neoformans*nak bizonyult törzsek minegyikére hatással volt. Aktív volt továbbá a nyolc C szerotípusú törzzsel ill. a nyolc klinikai izolátummal szemben. A *C. albidus* faj képviselői azonban ellenálltak a toxin hatásának, ugyanúgy, mint a *C. neoformans* referencia törzzsel párosodni képtelen, A szerotípusú törzsek (Függelék 9.2.).

4.4.1.3. Az FC-1 toxin hatása egyéb gomba törzsekre

Az előző vizsgálatok során úgy tűnt, a toxin szűk hatásspektrumú, elsősorban *Cryptococcus neoformans*-ra ill. rokon fajokra hat. Ennek megerősítése érdekében további gomba törzseket, élesztő- és fonalas gombákat egyaránt vizsgáltunk a toxinnal szembeni érzékenységre (Függelék 10.1., 10.3). A fent említett *C. laurentii*, *C. podzolicus* törzseken kívül, a 32 vizsgált *Candida* törzs közül egy, *C. quillermondi*, a 6 *Torulopsis* közül egy *Paratorulopsis pseudaerina* ill. a 31 *Schizosaccharomyces* közül két, azonos törzsből származó *S. pombe* aminosav-auxotróf mutáns bizonyult érzékenynek az FC-1 toxinra.

4.4.1.4. Következtetések

Eredményeink azt mutatják, hogy a legtöbb *C. neoformans* törzs - függetlenül szero-párosodási- és molekuláris típusuktól, valamint származási helyüktől – érzékeny az FC-1 toxinra. Míg a *Cryptococcus* nemzetségbe tartozó, két vizsgált *C. laurentii* törzs közül egy, valamint a *C. podzolicus* érzékenynek bizonyultak, míg a *C. albidus* törzsek rezisztensnek mutatkoztak.

A mutáns *Schizosaccharomyces* törzsek érzékenysége valószínűleg az UV-mutagenezis során keletkezett mutációkból adódik. Ezt alátámasztja, hogy a kiindulási törzs, valamint a más aminosavakra auxotróf mutánsok nem érzékenyek a toxinra. Érdekes a szintén oppurtunista humán patogén *C. guilliermondii* egy törzsének érzékenysége, mivel más *Candida* fajok és a további öt vizsgált *C. guilliermondii* törzs egyike sem bizonyult szenzitívnek. A *Paratorulopsis pseudaerina* szintén a *Filobasidiaceae* családba tartozik, így érzékenysége nem meglepő.

4.4.2. Az FC-1 toxin azonosítása, részleges tisztítása

4.4.2.1. Méretének becslése

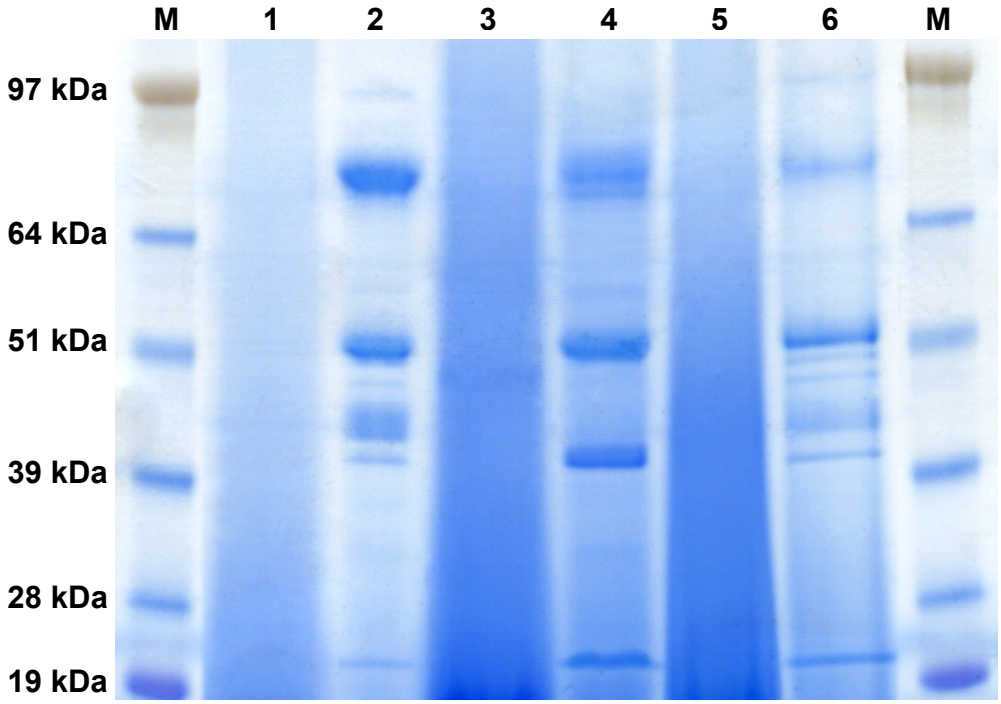
Az FC-1 toxin méretének becslése érdekében különböző áteresztőképességgel rendelkező Millipore szűrőkön engedtük keresztül a *F. capsuligenum* fermentlevét, majd a szűrő feletti ill. alatti oldatot eredeti térfogatra kiegészítve biotesztben aktivitást mértünk (4-6. táblázat). Eredményeink azt mutatták, hogy a toxin mérete a 30 és 50 kDa közötti tartományba esik, mivel az 50 kDa-os szűrőn még átjutott, míg a 30 kDa-ig áteresztő Millipore oszlop alsó frakciójából már nem tudtunk aktivitást kimutatni.

Szűrő pórusátmérője (kDa)	Gátlási zónák (mm)		
	Alsó rész	Felső rész	Kontroll
30	-	21	22
50	16	21	23
100	20	18	23

4-6. táblázat: Az FC-1 toxin méretének becslése különböző pórusátmérőjű Millipore oszlopok segítségével.

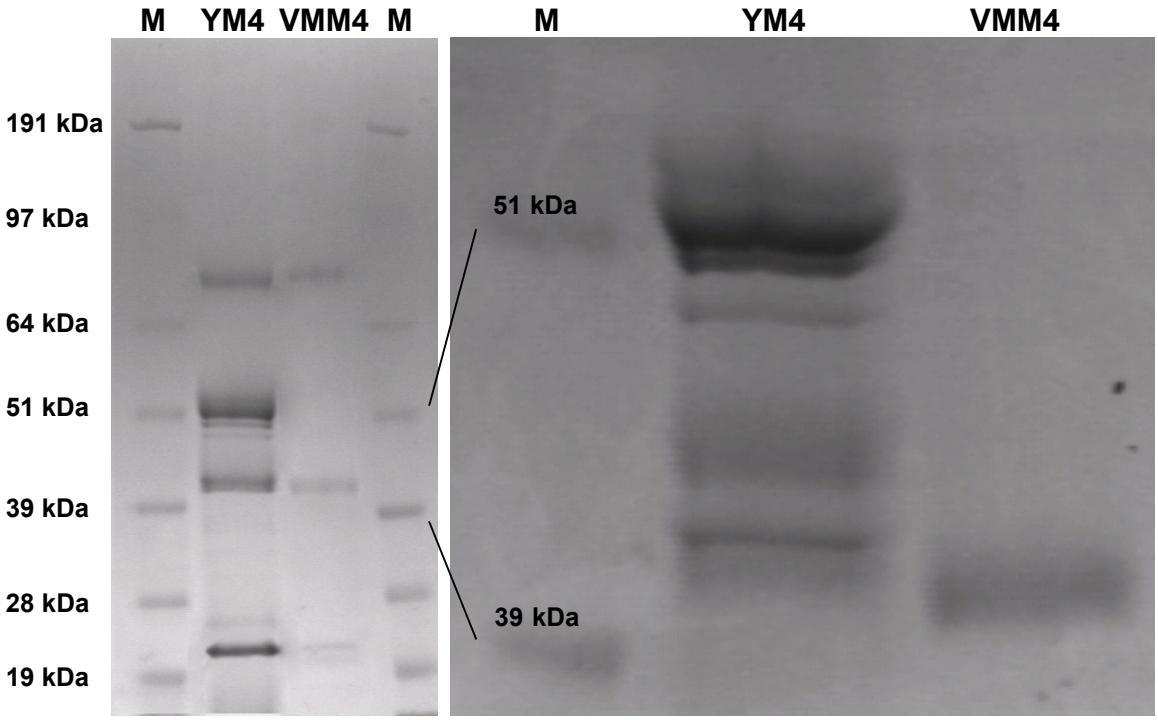
4.4.2.2. Különböző tápoldatban növesztett IFM 40078 extracelluláris fehérje-mintázata

Az YM4 tápoldatban termelődött a legrövidebb idő alatt a legnagyobb mennyiségű toxin, míg 2xYPD ill. különösen 2xYD tápoldatban jelentősen kevesebb. Ezen tápoldatokban nevelt *F. capsuligenum* fermentleveiből fehérjekivonatot készítettünk, majd SDS-gélelektroforézissel elválasztottuk. Mindhárom esetben számos (6-8) fehérjesáv különült el, melyek közül egyik sem mutatott a toxin aktivitásának megfelelő intenzitásbeli különbséget (4-12. ábra).



4-12. ábra: *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzsének extracelluláris fehérjemintázata különböző tápoldatokban nevelve. **1.** YD4 tápoldat, **2.** YD4 tápoldatban növesztett IFM 40078 törzs fermentleve (aktivitás 1,1 cm), **3.** 2xYPD4 tápoldat, **4.** 2xYPD4 tápoldatban növesztett IFM 40078 törzs fermentleve (aktivitás 1,9 cm), **5.** YM4 tápoldat, **6.** YM4 tápoldatban növesztett IFM 40078 törzs fermentleve (aktivitás 1,9 cm).

Összehasonlítottuk az YM4-tápoldatban termeltetett aktív fermentlé SDS fehérjemintázatát aktivitást nem mutató vitaminos, minimál (VM4) tápoldatban tenyésztett *F. capsuligenum* fermentlé SDS-mintázatával (4-13. ábra). Egyértelmű eredményt azonban így sem kaptuk, mivel a VM4 mintázatából számos sáv hiányzott az YM4-éhez képest, így a toxinnak megfelelőt sávot nem tudtuk azonosítani.



4-13. ábra: *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzsének **YM4** ill. **VMM4** tápoldatban nevelt tenyészetének extracelluláris fehérje-mintázata. A jobb oldali képen rövidebb, a bal oldalin hosszabb futás látható. **M:** Fehérje molekulasúly-marker.

4.4.2.3. Termelő és nem termelő törzsek extracelluláris fehérjemintázatának összehasonlítása

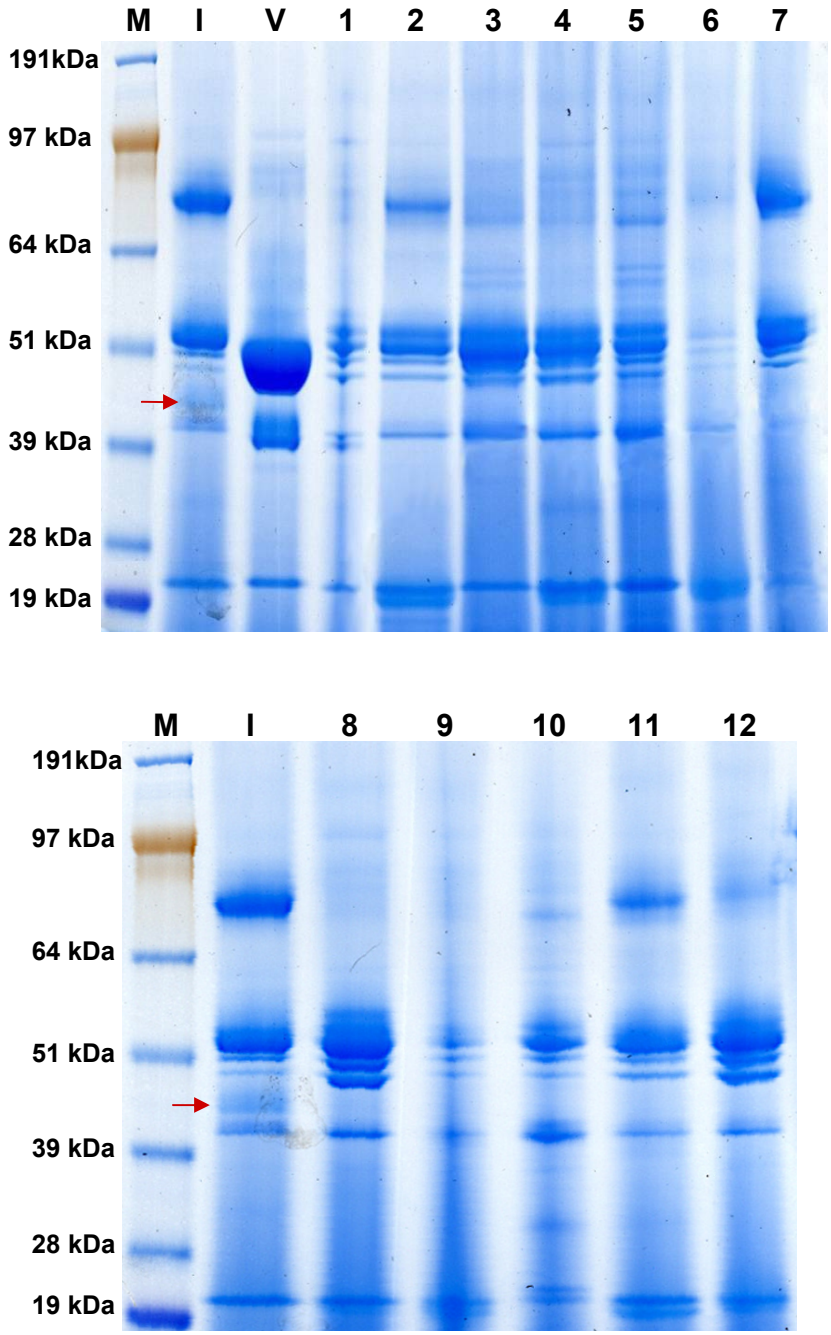
Feltételeztük, hogy a termelésre képes ill. nem képes törzsek extracelluláris fehérje mintázatának összehasonlításával elkülöníthető olyan fehérje sáv, mely az előbbiekben megtalálható, míg az utóbbiakból hiányzik, így a toxin azonosíthatóvá válik.

4.4.2.3.1. Nem termelő mutáns törzsek előállítása

Olyan törzs előállítása érdekében, mely csak toxintermelésben különbözik a termelőtől, az IFM 40078 törzsből UV-mutagenezissel nem termelő mutánsokat állítottunk elő. Először felmértük a sejtek túlélőképességét növekvő besugárzási idő függvényében. Ezután a 20%-os vagy ennél kisebb túlélési tartományhoz tartozó besugárzási dózissal kezeltük az élesztősejteket. A túlélő telepek kifejlődése után, killer – aktivitást nem mutató telepek felderítése érdekében – átreplikáztuk őket masszívan oltott *C. neoformans* IFM 5488 sejteket tartalmazó csészékre. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az így nyert telepek többsége nem stabil mutáns, néhány átoltást követően revertálódik. Sikerült azonban 12 mutánst előállítani, melyek 5-10 leoltást követően sem mutattak killer fenotípust.

4.4.2.3.2. Mutáns törzsek, a nem termelő VKM 1513 és a termelő IFM40078 extracelluláris fehérje-mintázatainak összehasonlítása

A nem termelő VKM 1513 törzs ill. a k^- mutánsok fermentleveiből készített fehérjekivonatot SDS-gélelektroforézissel elválasztottuk (4-14. ábra). A termelő törzsnél megfigyeltünk egy olyan fehérjesávot (kb. 40 kDa), mely a k^- mutánsok esetén nem volt megtalálható, ill. egy kisebb (kb. 25 kDa) sávot, mely több mutáns esetén is kettévált. Az előbbi sáv szekvenálása során kiderült, hogy valószínűleg két vagy több fehérjének felel meg.



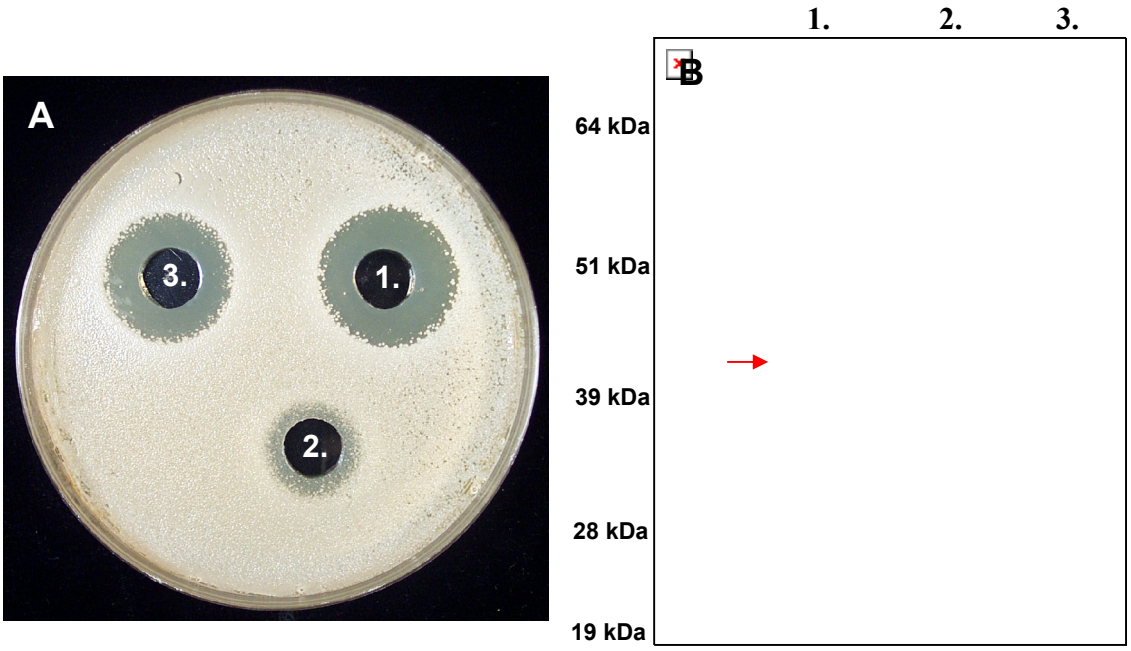
4-14. ábra: *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 (k^+), VKM 1513 (k^-) és IFM 40078 törzsből előállított nem termelő mutánsok extracelluláris fehérjemintázata. M: Fehérje molekulasúly marker, **I**: IFM40078 termelő törzs, **V**: VKM1513 törzs, **1-12**: nem termelő mutáns törzsek.

4.4.2.4. Az FC-1 toxin tisztítása célsejtekhez való kötődését kihasználva

A legtöbb ismert toxin hatása során első lépésben az érzékeny sejt sejtfali receptorához köt. Ez a kötés általában igen specifikus, legtöbb esetben ez határozza meg a toxinérzékenységet. Kísérleteink következő szakaszában ezt a kötést kihasználva próbáltuk a toxint azonosítani, tisztítani.

4.4.2.4.1. A Toxin kötődése célsejtekhez

Először megvizsgáltuk, hogy az FC-1 toxin is kötődik-e az érzékeny sejtekhez. Ehhez *C. neoformans* sejteket különböző koncentrációban szuszpendáltunk *F. capsuligenum* toxintartalmú fermentlevében. Ezt követően, mivel az irodalmi adatok szerint a toxin kötődése a sejtfalhoz a legtöbb esetben gyorsan lejátszódó folyamat, fél óráig inkubáltuk a fermentlevet, majd a *C. neoformans* sejtek lecentrifugálása után mértük az oldat maradék aktivitását. Eredményeink azt mutatták, hogy a fermentlé a kezelés hatására vesztett aktivitásából, a toxin valóban kikötődött a sejtek falán (4-15. A ábra).

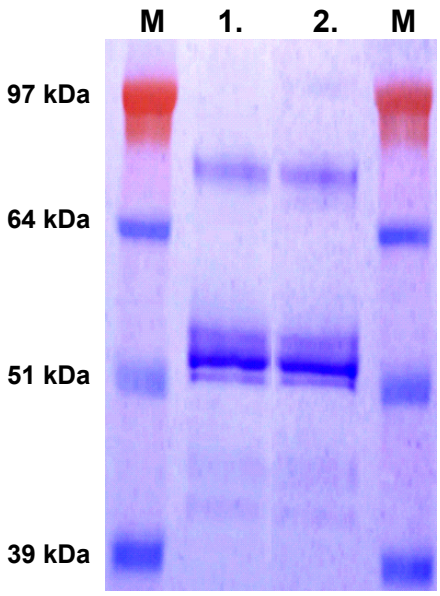


4-15. ábra: FC-1 toxin kötődése *Cryptococcus neoformans* IFM 5844 sejtekhez. **A**: fermentlevek gátlása. **B:** Fermentlevek SDS-gélelektroforézise. **1.** Kontroll, kezeletlen fermentlé (aktivitás 2,4 cm), **2.** *C. neoformans* sejtekkel, 10^9 sejtkoncentrációban összekevert fermentlé (aktivitás 2,2 cm). **3.** *C. neoformans* sejtekkel, $2{,}2x10^{10}$ sejtkoncentrációban összekevert fermentlé (aktivitás 1,5 cm).

Ezután a kezelt és kezeletlen fermentleveket SDS-gélelektroforézissel elválasztottuk, olyan sávot keresve, melynek intenzitás változása megfelel a toxin aktivitás változásainak. Bár egy 40 kDa körüli fehérje a 10^9 sejt koncentrációjú kezelés után halványabbnak látszott, az eredmény nem volt egyértelmű, mivel a többi sáv is gyengébbnek bizonyult. Különösen igaz ez $2{,}2x10^{10}$ sejtkoncentrációnál, ahol valószínűleg a fehérjék nem specifikusan is a sejtekhez vagy a sejtek közé tapadtak, így minden fehérje sáv elhalványult (4-15. B ábra).

4.4.2.4.2. Tisztítás célsejtek felhasználásával

Mivel az előző kísérletek segítségével nem sikerült azonosítani a toxinfehérjét az előbbiekben leírt sejtfalhoz kötődést kihasználva megkíséreltük kitisztítani. Érzékeny *C. neoformans* IFM5844 ill. nem érzékeny *S. cerevisiae* sejteket kezeltünk toxint tartalmazó fermentlével, majd centrifugálás után a sejteken megkötött toxint NaCl-tartalmú citrát-foszfát pufferrel lemostuk. Nem tapasztaltunk azonban különbséget a két sejttípus mosása utáni toxinaktivitásban, mely arra utal, hogy a lemosott toxin nem specifikus kötődés eredményeként került a sejtekre, inkább csak összetapadt nagy számú sejttömeggel a centrifugálások során. A másik lehetőség, hogy a toxin-hatás specifikusságában a sejtfali receptorokon kívül más faktorok is szerepet játszanak. Ezeket az aktív frakciókat SDS-gélelektroforézissel elválasztva (4-16. ábra) számos nem specifikusan kötő fehérjét sikerült a fermentléből visszaizolálni, mely inkább az előbbi lehetőséget támasztja alá. Ez a módszer így nem tűnt alkalmasnak az FC-1 toxin tisztítására.

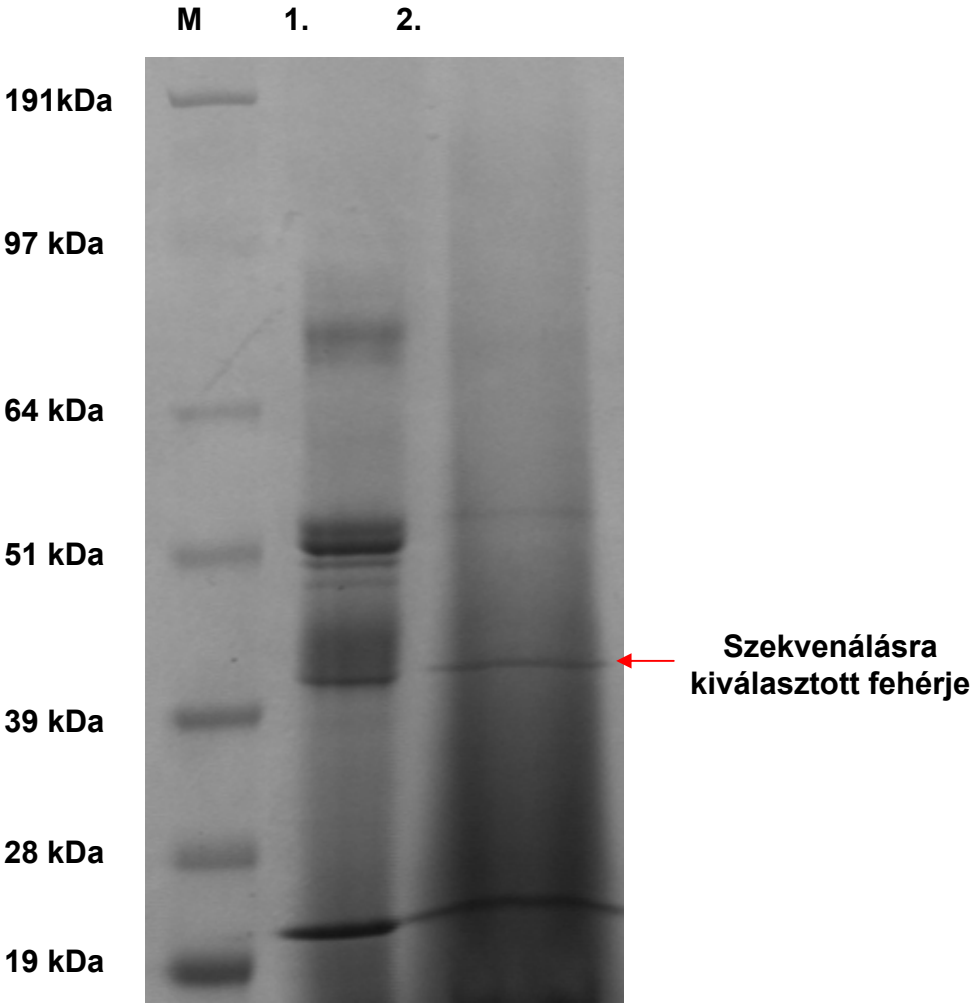


4-16. ábra: Lemosás után kapott aktív oldat SDS-gélelektroforézise. Minták: **M** molekulasúly-marker, **1.** *Cryptococcus neoformans* sejtekkel „kifogott" toxin, **2.** *Saccharomyces cerevisiae* sejtekkel „kifogott" toxin

4.4.2.5. Tisztítás affinitás-kromatográfiával

Az előzőekben leírt kísérletek nem egyértelmű, kis hatékonyságú eredményeit követően specifikusabb módszert használtunk a toxin tisztítására. A dolgozat későbbi részében leírt kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a toxin sejtfali receptora valószínűleg a pusztulán (β-1,6-glükán) (4.4.3.1. fejezet). Ezt a kötődést kihasználva, affinitás-kromatográfiás módszerrel próbáltuk meg a toxin tisztítását. Epoxi-aktivált Sepharose 6B mátrixhoz pusztulánt kötöttünk ligandként, majd a NaCl-os lemosással kapott aktív frakciókat – töményítés után – szintén SDS-gélelektroforézissel választottuk el (4-17. ábra).

Az így kapott eredmények alapján egy kb. 45 kDa méretű fehérjét választottunk el, melyet PVDF-membránra blottolás (25 mM Bicine, 25 mM Bis-Tris pH7,2 transzfer puffer) után, Coomassie-R 250 festést követően *N*-terminális szekvenciája alapján Edman degradációval próbáltunk azonosítani. A kapott szekvenciára (G/F T/L P E Y A/P Q T/A) az adatbázisokban nem találtunk jellegzetes homológiát.



4-17. ábra: *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzs fermentlevének affinitás-kromatográfiájából származó aktív frakció SDS-gél elektroforézise. **M:** Fehérje molekulasúly-marker, **1.** YM4 tápoldatban tenyésztett IFM 40078 toxint tartalmazó fermentleve (aktivitás: 2,3 cm), **2.** affinitás-kromatográfia aktív frakciója (aktivitás: 2,2 cm).

4.4.2.6. Következtetések

A *F. capsuligenum* IFM40078 törzs FC-1 toxinjának azonosításához először különböző pórusátmérőjű membránokon átszűrve meghatároztuk méretét, mely 30-50 kDa-nak adódott. Ez a méret az irodalomban leírt toxinok többségének megfelel. Különböző tápoldatokban termelt, különböző aktivitású fermentlevek SDS-gélelektroforézise során nem tapasztaltunk egyetlen sáv esetén sem egyértelmű intenzitásbeli különbséget. Minimál tápoldat esetén pedig – ahol egyáltalán nem láttunk toxinaktivitást – számos sáv hiányzott a kontroll YM4 tápoldathoz képest. Így ezek az összehasonlítások nem vezettek egyértelmű eredményre. Nem termelő mutánsok előállítása után ezek, illetve a nem termelő VKM 1513 törzs fermentlevének elválasztásakor egy 40 kDa nagyságú fehérje hiányzott az aktív fermentlé mintázatához képest. Ennek szekvenálásakor azonban kiderült, hogy két vagy több fehérjének felel meg. Mivel ezekkel a módszerekkel nem sikerült azonosítani az FC-1 toxint, megkíséreltük, a célsejtek sejtfali receptorhoz való kötődést kihasználva kitisztítani. Ez közvetlenül az élesztősejtek felhasználásával nem járt eredménnyel. A sejtfali receptort (pusztulán) közvetlenül felhasználva affinitás-kromatográfia során azonban sikerült aktív frakciókat gyűjteni, majd ezek SDS-gélelektroforézisével 3 fehérjesávot elkülöníteni, melyek közül egy esett bele a fent leírt mérettartományba. Ennek a fehérjének *N*-terminális szekvenciái azonban nem mutattak szignifikáns homológiát sem egyéb toxinokkal, sem más ismert fehérjével. Mivel egyéb ismert toxinok szekvenciáit összehasonlítva egymással sem kaptunk jelentős homológiát, ez az eredmény nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy a killer-hatásért ez a fehérje lenne felelős.

4.4.3. Az FC-1 toxin hatásmódja

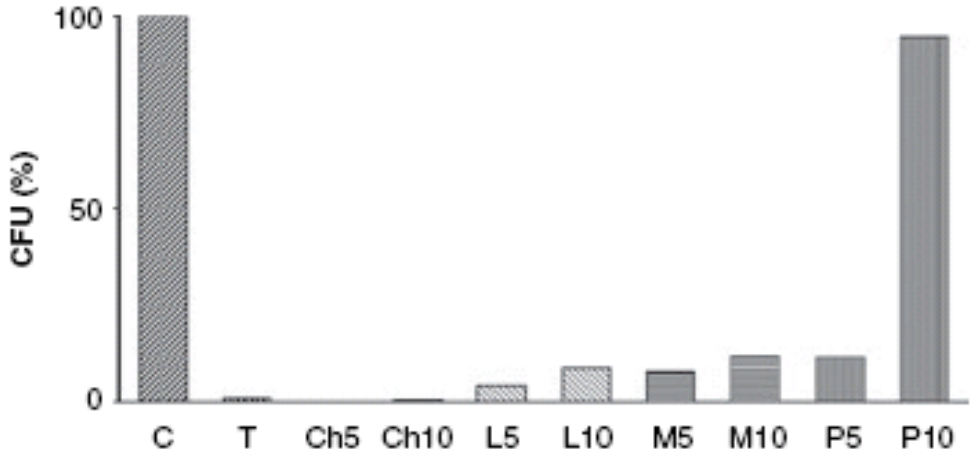
4.4.3.1. Sejtfali receptorhely azonosítása

Feltételezve, hogy az FC-1 toxin más killer toxinokhoz hasonlóan rendelkezik sejtfali receptorral, különböző sejtfalalkotó poliszacharidokhoz (kitin, mannán, pusztulán (ß-1,6-glükán) és laminarin (ß-1,3-glükán)) való kötődését teszteltük. Azt találtuk, hogy csak a pusztulán csökkentette szignifikánsan a toxin aktivitását (4-18. ábra).

4-18. ábra: *Filobasidium capsuligenum* fermentlevének visszamaradó aktivitása különböző sejtfalpolimerekkel történt inkubálás után. Érzékeny háttér: *Cryptococcus neoformans* IFM 5844. **1.** Hőinaktivált kontroll, **2.** Aktív toxin kontroll, **3.** Aktív toxin kontroll hígítva a további minták koncentrációjának megfelelően **4.** Toxin + 10 mg/ml pusztulán, **5.** Toxin + 10 mg/ml laminarin, **6.** Toxin + 10 mg/ml mannán **7.** Toxin + 10 mg/ml kitin

Hasonló eredményt kaptunk, ha a sejtfalalkotók jelenlétében kezeltük toxinnal a *C. neoformans* IFM 5844 sejteket. $5x10^5$ sejt leoltása után, hőkezelt toxin jelenlétében, 24 óra inkubációt követően a tenyészetből vett mintában $4,1x10^6$ CFU volt kimutatható milliliterenként. Aktív toxin jelenlétében a CFU-k száma azonban majdnem nullára csökkent. Kitin oligoszaccharidokkal (5-6 oligo), mannánnal és laminarinnal együtt inkubálva a *C. neoformans* sejteket toxint tartalmazó fermentlében, a sejtfalalkotók sem

5, sem 10 mg/ml koncentrációban nem voltak képesek a toxint inaktiválva megmenteni a sejteket a pusztulástól. Pusztulán azonban 10 mg/ml koncentrációban képes volt a toxin aktivitást csökkenteni, így a tenyészetből vett minta sejtkoncentrációja megközelítette a hőinaktivált toxint tartalmazó kontroll CFU értékét (4-19. ábra).

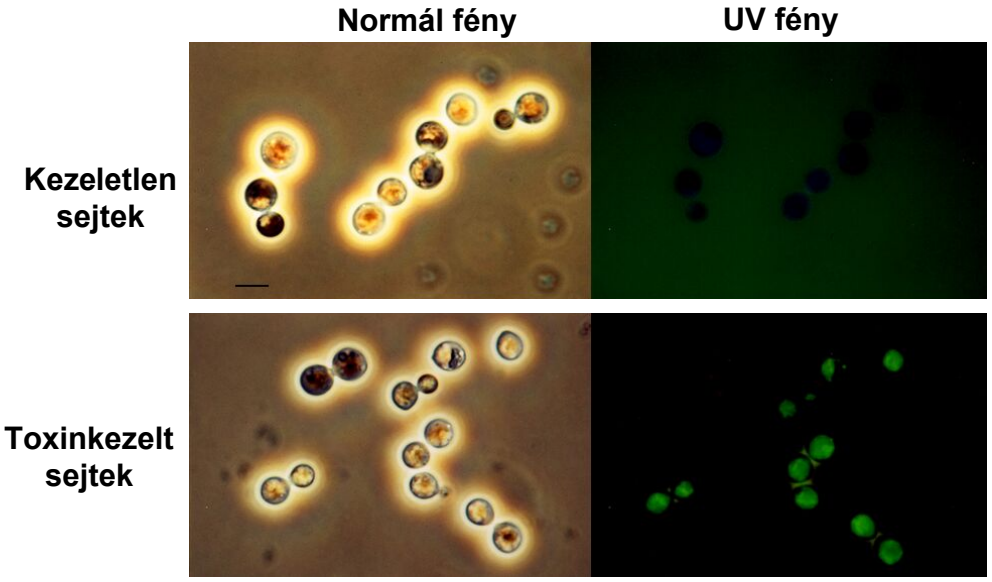


4-19. ábra: Sejtfalalkotó poliszaccharidok toxin kötő képességének vizsgálata kompetíciós próba során. A *Cryptococcus neoformans* IFM 5844 törzs sejtjei toxint tartalmazó fermentlében különböző sejtfalalkotók különböző koncentrációja mellett inkubálódtak 24 órán keresztül. A sejtek túlélését a tenyészetből vett minta 1 ml-re számolt telepképző egységek meghatározásával mértük. 100% a hőinaktivált toxint tartalmazó fermenté CFU/ml értéke. **C**: hőinaktivált toxinnal kezelt kontroll, **T**: aktív toxinnal kezelt kontroll, **Ch**: kitin, **L**: laminarin, **M**: mannán, **P**: pusztulán, **5**: 5 mg/ml koncentráció, **10**: 10 mg/ml koncentráció.

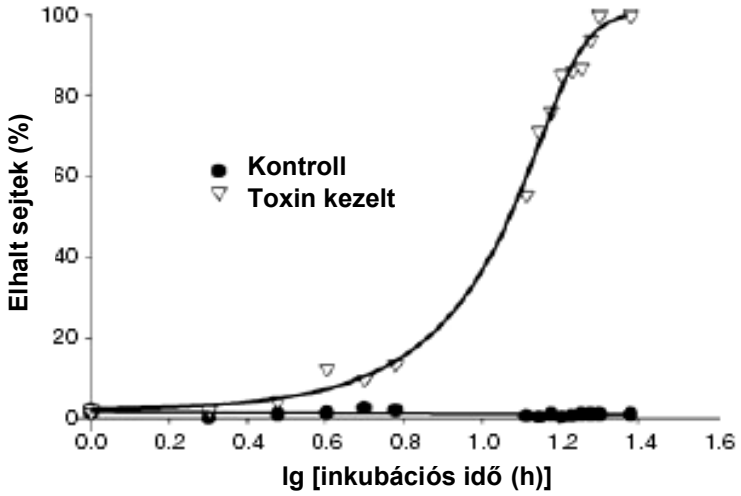
4.4.3.2. Növekedésgátlás vizsgálata (citocidikus vagy citosztatikus hatás)

Annak eldöntésére, hogy a toxin a növekedést csak gátolja (citosztatikus hatású), vagy el is pusztítja az érzékeny sejteket (citocidikus hatású), 10^5 *C. neoformans* IFM 5844 sejtet inkubáltunk *F. capsuligenum* aktív toxint tartalmazó ill. hőinaktivált fermentlevével 24 órán keresztül, majd telepképző egységeiket számolva összehasonlítottuk a sejtek túlélési arányát. Míg az inaktivált fermentlében a CFU-k száma $4{,}1 \times 10^6$-ra emelkedett, addig az aktív toxin jelenlétében a sejtek elpusztultak és egyetlen telep sem képződött. Mindez arra utal, hogy a sejt citocidikus hatású, nem csak megállítja a sejtek növekedését, hanem el is pusztítja azokat.

Ezt megerősítették azok a kísérletek is melyek során az érzékeny sejtek pusztulásának kinetikáját FITC (fluoreszcein-izotiocianát) festéssel követtük (4-20. ábra). A FITC egy fluoreszcens festék, mely UV-fényben világít, és ha a sejtmembrán roncsolódik, képes az élesztősejtbe bejutni és az elhalt sejteket megfesteni. Kísérleteink során kezeletlen ill. toxinnal inkubált *C. neoformans* sejtekről készítettünk felvételeket normál (fehér) és UV-fénnyel történő megvilágításban. Kezeletlen sejtek esetében a sejtmembrán intakt maradt, a festék nem jutott a sejteken belülre, így itt fluoreszcenciát nem tapasztaltunk. Toxinkezelt sejtek esetében azonban jól látható, hogy a sejtmembrán dezorganizációja lehetővé tette a FITC sejtekbe jutását, így UV-fényben az elhalt sejtek fluoreszkálnak. 12 órás toxinkezelés után az élő sejtek aránya az elpusztult sejtekhez képest 50%-ra esett vissza, míg 20 óra múlva már 0%-ra csökkent (4-21. ábra). Folyadékkultúrában tenyésztve, hőkezelt toxin jelenlétében a sejtek száma folyamatosan nőtt, körülbelül 3-4 órás duplikációs idővel, míg aktív toxin jelenlétében a sejtek egyáltalán nem szaporodtak.



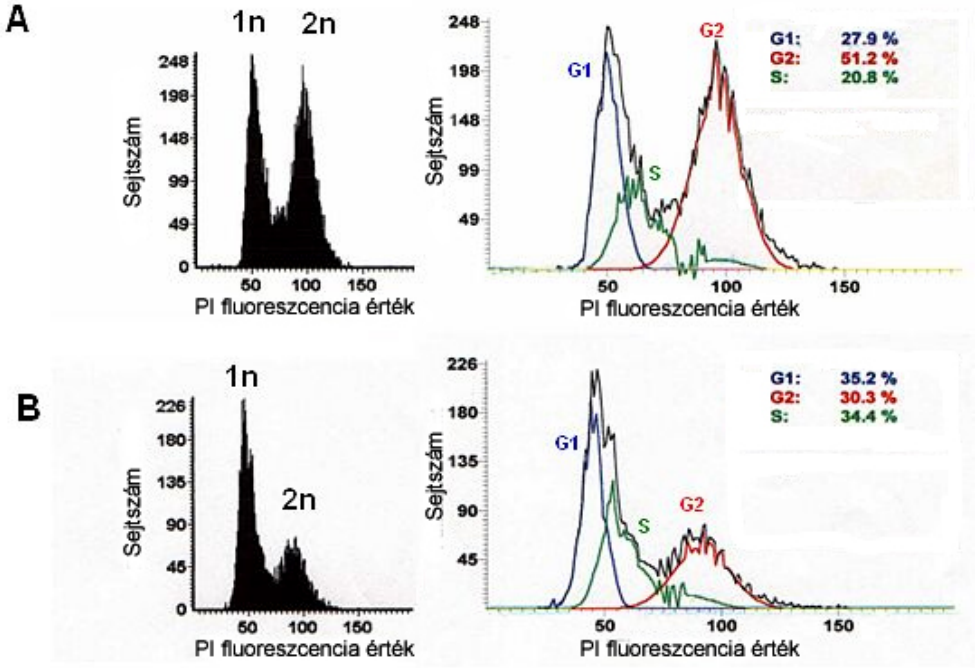
4-20. ábra: Kezeletlen, hőkezelt és toxinkezelt *Cryptococcus neoformans* IFM 5844 sejtek FITC-festése. A sejteket normál (fehér) ill. UV-fénnyel világítottuk, 1000x-es nagyítás mellett fluoreszcens mikroszkópban



4-21. ábra: FC-1 toxinra érzékeny *Cryptococcus neoformans* törzs túlélése a toxinkezelés során. Az élő illetve elpusztult sejtek arányát 200 sejt FITC-festésével határoztuk meg. A kontroll mintában a toxint hőkezeléssel inaktiváltuk. Az eredmény három független kísérlet átlaga.

4.4.3.3. A toxin hatása az érzékeny sejtek sejtciklusára

Mivel számos toxin esetében leírtak a DNS-szintézisét ill. a sejtciklust gátló hatást, megvizsgáltuk, hogy az FC-1 toxinnak van-e hasonló hatása. Ehhez toxinkezelt, ill. kezeletlen sejtek DNS-tartalmát mértük lézer szkenning citometria segítségével. A G_1, S, ill. G_2/M fázisban lévő sejtek arányát szintén meghatároztunk. A kezeletlen sejtek két jellemző csúcsot mutattak, melyek megfelelnek a haploid IFM 5844-es törzs S fázis előtti 1n DNS-tartalmának, ill. az S fázis utáni 2n DNS-tartalmának. A kettő közti terület reprezentálja az S fázisban lévő sejteket. Eredményeink alapján a sejtek 30%-a G1, 20%-a S, 50%-a pedig G2 fázisban volt (4-22. ábra). A toxinkezelt sejtekben szintén megtalálható a haploid ill. diploid állapotot jelző két csúcs. Ezen sejteknek 35%-a G1, 35%-a S és 30%-a G2 fázisban volt. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a sejtek nem maradtak G1 fázisban a toxinkezelés hatására, tehát a toxin nem gátolta a sejtek DNS-állományának megkétszereződését.



4-22. ábra: Sejtciklus analízise lézer szkenning citometriával. Az egyedi sejtek DNS-tartalmát a megfestett sejtmag fluoreszcencia intenzitása alapján mértük. A vízszintes tengelyen a a propídium-jodid (PI) fluoreszcenciája látható. A függőleges tengely adott PI fluoreszcencia-értéket kibocsátó sejtek számát jelöli. Az 1n ill. 2n állapotnak megfelelő csúcsokat külön jelöltük. Az első csúcs alatti terület a G1 (1n DNS), a második a G2 (2n DNS) fázisban lévő sejteket reprezentálja, míg a kettő közötti terület az S fázisú sejteknek felel meg. Kezeletlen (**A**) és toxinkezelt (**B**) sejteket vizsgáltunk. Az ábrákon feltüntettük a G1, G2, és S fázisban lévő sejtek százalékos arányát is.

4.4.4. Toxinok hatása az érzékeny sejtek protoplasztjaira

A toxinok sejtfalra gyakorolt hatását izoozmotikus közegben vizsgáltuk. Ha a toxin a sejtfalat támadja, ez a környezet megvédené a képződő szfero- ill. protoplasztokat a pusztulástól. 10^5 érzékeny sejtet 0,9 mol/l szorbitol jelenlétében kezeltünk aktív toxinnal 24 órán keresztül. A kezelés után azonban még szorbitollal kiegészített táptalajon sem tapasztaltunk telepnövekedést, így valószínűsíthető, hogy a toxinhatás nem a sejtfal dezorganizációján ill. szintézisének gátlásán keresztül nyilvánul meg.

4.4.5. Következtetések

A különböző toxinok eltérő sejtfali receptorokkal rendelkeznek. Az FC-1 toxin esetében kompetíciós tesztek alapján ez valószínűleg a pusztulán (β-1,6-glükán). A toxin hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a toxin citocidikus hatású. A toxin által elpusztított sejtek festődése FITC-el arra utal, hogy a toxinnak membrán- vagy sejtfalkárosító hatása van. További vizsgálatok során az érzékeny sejtek DNS-tartalmának lézer szkenning citometriájával megállapítottuk, hogy a toxin nem gátolja a sejtciklus folyamatát. Mivel az izoozmotikus környezet sem védte meg az érzékeny sejteket a pusztulástól, azt is megállapíthatjuk, hogy a toxin nem a sejtfalat támadja. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az FC-1 toxin a sejtmembránt károsítja, mint azt már számos más toxin esetében megfigyelték (Schmitt & Breinig, 2002).

5. Összefoglalás

A killer toxinok vagy mikocinek gombák által termelt oligopeptidek, proteinek, glikoproteinek, melyek közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás nélkül képesek elpusztítani más, arra érzékeny gombasejteket. Elsőször *S. cerevisiae* által termelt toxinokat írtak le 1963-ban. Azóta már számos más élesztőtörzsben kimutatták a toxintermelés képességét, és egyre több ismeret halmozódott fel e toxinok genetikai hátteréről, termelődéséről, specificitásukat, immunitásukat meghatározó tényezőkről, ill. hatásmechanizmusukról. Mindezek nagyban hozzájárultak különböző biológiai folyamatok pontosabb megértéséhez. Mivel a toxinok általában csak a termelő törzzsel rokon gombákra hatnak, melyek köre jól behatárolható, felmerült a különböző toxinokra való érzékenység taxonómiai bélyegként való használata. A toxinok antifungális szerként történő alkalmazása számos ipari és klinikai felhasználási lehetőséget vet fel. Patogén élesztők ellen hatásos mikocinek aktív centrumát leképező anti-idiotipikus antitestek, melyek a toxinok nem kívánatos tulajdonságai nélkül képesek e gombák elpusztítására, közvetlenül is felhasználhatóak lehetnek szisztémás mikózisok kezelésére. A toxinok széleskörű tanulmányozása mellett igen kevés adat található az irodalomban a termelő törzsekről. Ismert, hogy egy adott fajon belül nem minden törzs rendelkezik killer-fenotípussal. Az egy fajon belüli termelő ill. nem termelő törzsek filogenetikai kapcsolatait, elkülönülésük mértékét eddig nem tanulmányozták.

Munkánk során antikriptokokkális toxint termelő törzseket keresve számos élesztőtörzset teszteltünk, és csak egy *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzs esetében kaptunk pozitív eredményt. Ezután arra szerettünk volna választ kapni, hogy a *F. capsuligenum* fajon belül milyen gyakori a killer-fenotípus előfordulása. Ezért különböző törzsgyűjteményekből további kilenc, eltérő földrajzi helyekről és környezeti mintákból származó *F. capsuligenum* törzset szereztünk be. Ezek vizsgálatakor kiderült, hogy a faj képviselőinek viszonylag nagy hányada (40%) rendelkezik a toxintermelés képességével, valamint a toxint nem termelő törzsek mindegyike érzékeny a termelők által termelt mikocinokra. A neutrális, tehát nem termelő és nem érzékeny törzsek hiánya azt jelzi, hogy nem alakultak ki olyan vonalak, melyek elvesztették toxin-termelő képességüket, de immunitásuk megmaradt, mely utalhat a toxin kromoszómális

kódoltságára, mivel extrakromoszómális elemek könnyebben elvesznek, mint a magi genom részei.

A termelő és nem termelő *F. capsuligenum* törzsek közti kapcsolatok tisztázása érdekében először meghatároztuk párosodási típusukat. A nem termelő törzsek NCAIM Y-0472 kivételével mind **a**, míg a termelő törzsek kivétel nélkül α párosodási típussal rendelkeznek, mely utalhat arra, hogy a toxin termelése az α mating típushoz kötött.

Teljes nukleinsavkivonatok elválasztása során a magi DNS-en és a riboszómális RNS-eken kívül nem jelent meg egyéb sáv, mely megerősítette korábbi feltevésünket, miszerint a toxin termelése valószínűleg kromoszómálisan kódolt. Így a termelők és nem-termelők közti különbség is a magi genomban keresendő, és nem RNS vírusok ill. DNS plazmidok jelenléte okozza a fenotipikus eltérést. Mindezért a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy e két csoport genomja más régiókban is különbözik-e. Ennek eldöntésére az rDNS variábilis régióinak (ITS ill. D1/D2) szekvenciáit elemeztük, valamint PCR-fingerprinting és RAPD-analízist végeztünk. ITS-szekvenciájuk alapján a termelő ill. nem termelő törzsek e két csoporton belül csak minimálisan, (0,4%-ban) tértek el egymástól, a D1/D2-régiót tekintve pedig teljesen megegyeztek. Azonban a különböző csoporthoz tartozó törzsek közt igen nagy eltérés (1,6-2,24%) mutatkozott az rDNS-régiókban. A PCR-fingerprinting és RAPD-mintázatok alapján készített fenogram szintén alátámasztotta a termelő és nem termelő csoport különválását. A törzsek mtDNS-RFLP analízisével is hasonló eredményeket kaptunk, mely arra utal, hogy a két csoport nem csak magi genomjában, hanem extrakromoszómális szinten is eltérnek. A termelő ill. nem termelő törzsek nagy mértékű elkülönülése felveti a *F. capsuligenum* faj két varietasra osztásának lehetőségét.

Ezután a különböző törzsek által termelt toxinokat hasonlítottuk össze. Mind hatásspektrumukban, mind biokémiai tulajdonságaikban megegyeztek. Mind a négy törzs hatásos volt számos *C. neoformans* törzsre, függetlenül azok szero- és molekuláris típusától, valamint izolálásuk helyétől. Ez alól csupán egy törzs, a WM 161 jelentett kivételt, melyre egyik toxin sem volt hatással. Ennek oka lehet sejtfali ill. membránreceptorok eltérése, melyek megváltozása több toxin esetében bizonyult már felelősnek rezisztencia kialakulásáért. A négy toxin további élesztők vizsgálata során is azonos specificitással rendelkezett.

Mivel hatásspektrumuk alapján nem tudtuk őket elkülöníteni, különböző biokémiai tulajdonságaikat is összehasonlítottuk. A toxinok további tanulmányozásához azonban először biztosítatni kellett a toxinok termeléséhez szükséges optimális feltételeket, mivel irodalmi adatok szerint a különböző toxinok igen kis mennyiségben temelődnek. Különböző tápoldatokban növesztve a toxinokat, azt tapasztaltuk, hogy csak komplett tápoldat volt alkalmas aktív toxin termeltetésére. Pepton vagy malátakivonat hiányában sem élesztőkivonat, sem a 21 esszenciális aminosav hozzáadása nem volt elegendő biológiailag aktív fermentlé előállításához. Elölt, érzékeny *C. neoformans* sejtek jelenléte sem volt képes indukálni a toxin termelődését. Így nyitott kérdés maradt, hogy a komplett tápoldatok mely komponense szükséges aktív toxin termeléséhez. Eredményeink azt mutatják, hogy a toxintermelődéshez a növekvő sejteknek korai stacioner fázisba kell érniük. Tekintve, hogy a toxin a fiatal, logaritmikus fázisban lévő érzékeny sejteket pusztítja legerőteljesebben, a természetben a toxintermelés szerepe valószínűleg a már elfoglalt élőhelyek védelme az újonnan érkező, invazív törzsek ellen. Feltehetően a tápoldat pH-jának eltolódása semleges ill. lúgos irányba, vagy az öregedő sejtek erősödő proteáztermelése miatt, a késői stacioner fázisban már nem tudtunk killer aktivitást kimutatni.

A toxinok hőmérséklet ill. pH-optimumukat tekintve szintén megegyeztek: 30 °C felett inaktiválódtak, és hatásukat csak szűk, savas pH-n fejtették ki. Ennél magasabb pH a toxinokat inaktiválja. Mivel a pH visszaállításával sem nyerik vissza hatásosságukat, ez a folyamat valószínűleg irreverzibilis. Mindez arra is utal, hogy az alacsony pH nem közvetlenül az érzékeny sejtekkel való kölcsönhatást segíti, hanem a toxin stabilitásához szükséges.

A toxinok lehetnek proteinek, glikoproteinek, de antifungális hatást kifejthetnek más vegyületek, például glikolipidek is. A *F. capsuligenum* törzsek által termelt aktív hatóanyag proteintermészetének igazolására különböző proteináz enzimekkel kezeltük fermentleveiket, majd a maradék aktivitást biotesztben mértük. Pronáz E kezelés esetén jelentős aktivitáscsökkenést tapasztaltunk, mely alátámasztotta a toxin fehérjetermészetét. A többi proteinbontó enzim hatástalanságát okozhatja felismerő helyük hiánya a toxin fehérje-szekvenciájában, de valószínűleg szerepe lehet annak is, hogy ezek az enzimek savas pH-n nem működnek maximális hatékonysággal.

Mivel több megközelítést alkalmazva sem találtunk eltérést a négy törzs által termelt toxinok közt, megállapíthatjuk, hogy ezek igen hasonló, valószínűleg azonos felépítésű mikocinek.

Ezután a *F. capsuligenum* IFM40078 törzsének FC-1 toxinjának részletesebb tanulmányozásába kezdtünk. A toxin hatásspektrumának pontosabb megismeréséhez további *Cryptococcus* fajokat izoláltunk környezetből ill. klinikai mintákból, valamint számos további élesztő- és néhány fonalasgombán is teszteltük aktivitását. Eredményeink szerint a fent említett WM 161 törzs kivételével minden egyértelműen *C. neoformans*nak bizonyult törzs érzékenynek mutatkozott. A *Cryptococcus* nemzetségbe tartozó, két *C. laurentii* törzs közül egy, valamint a *C. podzolicus* érzékenynek, míg a *C. albidus* törzsek rezisztensnek mutatkoztak. Mivel a *C. neoformans* mellett a *C. albidus* is egyre gyakrabban fertőz, utóbbi rezisztenciája felhasználható lehet kriptokokkózist előidéző törzsek pontos azonosításához. Két *Schizosaccharomyces* mutáns törzs növekedését gátolta az FC-1 toxin, bár ezek érzékenysége valószínűleg az UV-mutagenezis során keletkezett mutációkból adódik. Érdekes a szintén oppurtunista humán patogén *Candida guilliermondii* egy törzsének érzékenysége, mivel sem más *Candida* fajok, sem a többi öt vizsgált *C. guilliermondii* törzs nem bizonyult szenzitívnek. Nem meglepő azonban a szintén *Filobasidiaceae* családba tartozó *Paratorulopsis pseudaerina* érzékenysége.

A toxin azonosítása érdekében először különböző pórusátmérőjű membránokon átszűrve meghatároztuk méretét, mely 30-50 kDa-nak adódott. Ez az érték megfelel az irodalomban leírt toxinok átlagos méretének. A toxin kimutatásához elvégeztük különböző tápoldatokban termelt, eltérő mértékű aktivitást mutató fermentlevek SDS-gélelektroforézisét. A kapott mintázatokban azonban nem figyeltünk meg olyan fehérjesávot, mely az aktivitásbeli eltéréseknek megfelelő intenzitásbeli különbséget mutatott volna. Aktivitást nem mutató, minimál tápoldat esetén pedig több (5-6) sáv hiányzott a kontroll YM4 tápoldathoz képest. Így ezek alapján nem sikerült a toxint egyértelműen azonosítani. Ezért, nem termelő mutánsok előállítása után ezek, illetve nem termelő VKM 1513 törzs fermentlevének SDS-fehérjemintázatát hasonlítottuk össze az IFM 40078 aktív fermentlevével. A nem termelő törzsek fermentlevéből egy 40 kDa nagyságú fehérje hiányzott az aktív fermentlé mintázatához képest. Ennek szekvenálásakor azonban kiderült, hogy ez a sáv két vagy több fehérjének felel meg.

Mivel a fenti módszerekkel nem sikerült egyértelműen azonosítani az FC-1 toxint, megkíséreltük kitisztítani. Először a célsejtek sejtfali receptorhoz való kötődését próbáltuk kihasználni, azonban ez közvetlenül az élesztősejtek felhasználásával nem járt eredménnyel. A feltételezett sejtfali receptort (pusztulánt) közvetlenül felhasználva, affinitás-kromatográfiával viszont sikerült aktív frakciókat gyűjteni, majd ezek SDS gélelektroforézisével 3 fehérjesávot elkülöníteni, melyek közül egy beleillett a fentiek során becsült mérettartományba. Ennek a fehérjének *N*-terminális szekvenciája nem mutatott szignifikáns homológiát sem egyéb toxinokkal, sem más ismert fehérjével. Mivel azonban az irodalomban leírt toxinok sem homológok egymással ez nem zárja ki, hogy a killer-aktivitásért ez a fehérje lenne felelős.

A továbbiakban kísérletet tettünk az FC-1 toxin hatásmechanizmusának felderítésére. Kompetíciós tesztek alapján a toxin valószínűleg a pusztulánhoz (β-1,6-glükánhoz) köt az érzékeny sejtek sejtfalán. A toxinhatás kinetikájának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a toxin citocidikus hatású. A sejtek pusztulását FITC-festéssel követtük, mely az elhalt sejtek sejtmembránján bejutva megfestette azokat. Ez a festődés a toxin membránkárosító hatására utal. A toxin hatásmechanizmusának további vizsgálatakor meghatároztuk az érzékeny sejtek DNS-tartalmát lézer szkenning citometriával. Megállapítottuk, hogy a toxin hatása nem sejtciklus-gátláson keresztül valósul meg. Mivel az izoozmotikus környezet sem védte meg az érzékeny sejteket a pusztulástól, az is feltehető, hogy a toxin nem a sejtfalat, ill. annak szintézisét támadja. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az FC-1 toxin számos más toxinhoz hasonlóan a sejtmembránt károsítja.

Munkánk során számos érdekes kérdés merült fel, melyek megválaszolására további kísérletek lennének szükségesek. A toxintermelés párosodási-típushoz való kötöttségének kivizsgálása érdekes, új eredményeket adhatna a killer toxinok kutatásához, ill. e törzsek antagonista viselkedésének pontosabb megértéséhez. Az FC-1 toxin specifikus hatását kihasználva további toxinokkal, esetleg egyéb, molekuláris módszerekkel kombinálva alkalmas lehet különböző törzsek, fajok elkülönítésére, epidemiológiai kérdések megválaszolására. A toxin nagyobb mértékű tisztítása, majd antiidiotipikus antitestek előállítása pedig elvezethet új, a patogén *C. neoformans* ellen hatásos antifungális terápia kifejlesztéséhez.

6. Summary

Killer toxins or mycocins are oligopeptides, proteins, glicoproteins which are able to kill other, sensitive strains without direct cell-cell ineraction. Killer phenotype was first described in 1963. Since then, many other yeast strains have been shown to produce killer toxins, and the knowledge on the genetic background, production, specificity, immunity and killing mechanisms of these toxins has been greatly broadened. Besides, as toxins are usually active only against strains that are closely related to the producer, sensitivity patterns to different toxins could stand for taxonomic significance. Nevertheless, the antifungal property of the toxins raises the possibility of many agricultural, industrial and medical applications. Anti-idiotypic antibodies mimicking the active centre of the mycocins active against pathogenic yeasts are able to kill these fungi without possessing the disadvantageous properties of the original toxin, thus they could be used directly against systemic mycoses. Though many studies have been carried out on the killer toxins, there is less information about the strains producing them. It is known, that not all strains belonging to the same species have killer-phenotype, but the phylogenetic relationships and the rate of divergence of producing and non-producing strains are unknown yet.

In this work yeast strains were screened for the production of anti-cryptococcal toxin. Only *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 proved to be able to kill *C. neoformans* cells. In order to explore the rate of occurrence of killer toxins within the *F. capsuligenum* species, we collected nine more strains from strain collections - originating from different geographical and environmental sources. A relatively high percentage of them (40%) had the ability to produce anti-cryptococcal toxin, and all the non-killers were sensitive to them. No neutral (not producing and not sensitive) strains were among the ten isolates indicating that no strains evolved that had lost their ability to produce toxin, but had retained their immunity. This might suggest that the gene(s) responsible for toxin production is/are encoded on chromosomal DNA, as extra chromosomal fragments are less stable than nuclear ones.

To reveal the relationships among producing and non-producing *F. capsuligenum* strains, first we identified their mating types. With one exeption (NCAIM Y-0472) all

non-producing strains had mating type **a** and all the producing ones had α; indicating a possible link between the killer-phenotype and α mating-type.

Electophoresis of total nucleic acid extracts of the producing strains showed no other bands than the nuclear DNA and the ribosomal RNAs, which supports our earlier suggestion, that the toxins are encoded on chromosomal DNA. Thus, the difference between producing and non-producing strains is at the chromosomal level, and not the presence of DNA plasmids or RNA viruses is responsible for the phenotypic alteration. Accordingly we examined whether the two groups also differ in other regions of their nuclear DNAs. Sequences of variable rDNA regions such as ITS and D1/D2 were compared, PCR-fingerprinting and RAPD-analysis was performed. The strains belonging to the producing groups were identical in their nucleotide sequences in the D1/D2 region, and slightly differed (0.4%) in their ITS regions. These were also true for the members of the non producing group. But high rate of divergence (1.6-2.24%) was observed between the two groups in both rDNA regions. The phenogram based on PCR-fingerpriting and RAPD data also confirmed the divergence of the two groups. Analysis of mtDNA-RFLP patterns gave similar results, indicating that these strains differ not only in their chromosomal DNA, but also at the extra chromosomal level. This high rate of difference could raise the possibility to the proposal for two varieties of *F. capsuligenum*.

After revealing the relationships between the producing and non-producing groups we compared the toxins of the strains with killer-phenotype. According to our results they were identical both in their specificity and in their biochemical properties. All four toxin-producing strains were active against numerous *C. neoformans* isolates, independently from their serotypes and molecular subtypes as well as from their source. There was only a single exception (WM 161) among the tested *C. neoformans* strains which showed resistance to all four toxins. This resistance can be resulted from differences in cell wall or membrane receptors, which are know to be responsible for resistance in many cases. The four toxins also showed identical specificities when other yeast strains were tested.

As the toxins were indistinguishable by their specificity, their biochemical characteristics were compared. However, to further study these toxins, the optimal parameters for toxin production had to be obtained, as according to the literature,

mycocins are usually extracted at low concentration. Growing the killer strains in different media revealed that only complete media are suitable for toxin production. In the absence of peptone or malt extract, the addition of yeast extract or the 21 essential amino acids was not sufficient for gaining biologically active substance. No toxin production was detectable in the presence of dead, sensitive *C. neoformans* either. Thus, the question, which components of the complete media are necessary for successful toxin production, remains open. According to our results the growing cells must reach the early stationary phase before they can produce detectable amounts of toxin. Toxins are the most active against young sensitive cells in their logarithmic phase suggesting the natural the role of killer toxins is to defend the occupied niche from new invasive strains. However, probably because of the increasing pH value or the cumulative protease production of the ageing cells, no killer activity can be detected in the late stationary phase of the culture.

The toxins also share common heat and pH optima. They are inactive above 30 °C and pH 5.5-6. As toxins do not reactivate with reestablishment of the low pH value, this process is probably irreversible. This also suggests that the role of the low pH is not in helping the interaction with the cell wall of the sensitive cells; rather it has function in the stability of the toxin.

Toxins can be proteins or glycoproteins, but other compounds such as glycolipids can also have antifungal effects. To prove the proteinaceous nature of antifungal agents produced by *F. capsuligenum* strains, they were treated with different proteinase enzymes, and their residual activity was measured in bio-assay. Proteinase E treatment resulted in significant loss of activity which confirms that these toxins are peptides, proteins or glycoproteins. The effectiveness of the other enzymes can be resulted from the absence of their recognition site but the reason also can be that low pH is not optimal for the function of these enzymes.

As no difference was detectable between the toxins of the four producing strains by different approaches, it can be concluded that these toxins are very similar, if not identical agents.

After these experiments, we intended to study the FC-1 toxin of IFM 40078. To examine the specificity of FC-1, we isolated and further tested *Cryptococcus* isolates

from environmental and clinical sources. Besides, several other yeasts and some filamentous fungi were studied for toxin sensitivity. Except for the above mentioned WM 161, all strains that proved to be *C. neoformans* were sensitive to FC-1. Within the genus *Cryptococcus* one strain out of two *C. laurentii* and *C. podzolicus* were sensitive while all strains of *C. albidus* showed resistance. Regarding that besides *C. neoformans*, *C. albidus* is more and more frequently infecting immunocompromised patients; its toxin resistance can be used for exact identification of the causative agent of cryptococcosis. Two *Schizosaccharomyces cerevisiae* mutants also showed resistance, but this is most probably caused by random mutations arising from UV mutagenesis. The sensitivity of one strain of *Candida quilliermondii* – another opportunistic human pathogen – is unique, because the other five examined *C. guilliermondii* strains and several other strains belonging to the genus *Candida* showed resistance. The sensitivity of a member of *Filobasidiaceae* – *Paratorulopsis pseudaeria* – is not surprising due to its close relationship to *F. capsuligenum*.

The size of the FC-1 toxin was determined by filtering the crude toxin through membranes with different pore size; revealing that the size of the toxin is between 30 and 50 kDa, which is in accordance with the size of other toxins in the literature. To identify the toxin, *F. capsuligenum* IFM 40078 was cultured in different media where the toxin activities varied. SDS gel electrophoresis was performed on the extracellular proteins of these cultures, but no bands could be observed with altered density according to the toxin activity. *F. capsuligenum* cultured in synthetic minimal medium had no toxin activity, and in its extracellular protein pattern several bands were missing compared to the YM4 control medium. Thus, with these methods we could not identify the FC-1 toxin. Nevertheless, non-producing mutants were generated by UV mutagenesis and their extracellular protein profiles were compared to the active control. The non-producing VKM 1513 strain was also involved in this comparison. One protein with approximately 40 kDa in molecular weight was missing from these non-producing strains. However, sequencing of this band showed that it contains two or more proteins.

As no exact identification was possible with the methods mentioned above, we aimed to purify the toxin. For this, we intended to exploit the interaction between the toxin and the cell wall of the sensitive cells. Binding directly to the sensitive cells was not

effective to purify the toxin. However, active fractions could be separated when the possible cell wall receptor (pustulan) was used as a ligand for affinity chromatography. SDS electrophoresis of these fractions showed three bands, one in the size region that we determined earlier as the possible size of FC-1. The *N*-terminal of this protein showed no significant homology to other toxins or proteins. However, regarding that homology between toxins is quite rare, the possibility that this protein is responsible for the killing activity can not be excluded.

In the last part of this study we intended to reveal the mechanism of action of the FC-1 toxin. As competition assays revealed, the possible cell wall receptor of FC-1 is β-1,6-glucan (pustulan). Studies on the kinetics of killing effect showed that the toxin has cytocydal effect. The numbers of dead cells was counted using FITC stain, which could penetrate through the disorganized cell membrane of the dead cells. This staining also indicates that the toxin acts by disorganizing the cell membrane or the cell wall. To explore whether FC-1 has an effect on cell cycle the DNA contents of the sensitive cells were measured. Following the analysis of the proportions of n and 2n state DNA it was revealed that the toxin has no effect on the cell cycle. As sensitive cells were not protected by isoosmotic environment, it can be presumed, that FC-1 – as several other toxins – expresses its killing effect by disorganising the cell membrane of the sensitive cells.

Many interesting questions arose during our work that has to be answered by further studies. Investigation of the possibility of a linkage between toxin production and mating type could add interesting and new results to our knowledge of killer toxins and antagonistic relationships between these strains. Taking an advantage from the specificity of the FC-1 toxin it could be applied – in combination with other toxins, or molecular methods – to identify species or strains with epidemiological interest. Besides, further purification of the toxin followed by generation of antiidiotypic antibodies can lead to a new, antifungal therapy effective against *C. neoformans*.

7. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Kucsera Juditnak, aki szakdolgozó korom óta irányítja és segíti munkámat. Köszönöm Dr. Pfeiffer Ilonának a laborban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét. Köszönöm továbbá Dr. Hamari Zsuzsannának és Farkas Zoltánnak, hogy kifogyhatatlan tanácsaikkal és biztatásukkal segítették munkámat.

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

Köszönettel tartozom Prof. Kanji Takeonak és Dr. Misako Ohkusunak (Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis Chiba University, Japán) a *Cryptococcus* törzsek szerotipizálásában és a lézer szkenning citometriában nyújtott segítségükért. Köszönöm Prof. Wladislav I. Golubevnek (VKM, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Puschino, Oroszország), hogy számos törzset rendelkezésünkre bocsájtott. Továbbá köszönettel tartozom Dr. Buzás Zsuzsannának (Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Gödöllő, Magyarország) a fehérjemunkák kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, és hogy ezek egy részét laboratóriumában végezhettem el. Köszönöm az anyagi támogatást az OTKA-nak (pályázati nyilvántartási szám: T 035194 IB2).

Hálásan köszönöm Édesanyámnak és Édesapámnak, valamint családom többi tagjának, hogy mindvégig mellettem álltak, és segítették tanulmányaimat. Hálás vagyok továbbá otthoni és szegedi barátaimnak, akik kitartottak mellettem, és lelkesedésükkel, bíztatásukkal segítették munkámat.

Mindemellett, bár sajnos nem követhette végig doktori munkámat, hálásan köszönöm Kevei Tanár Úrnak, hogy bevezetett a mikrobiológia és a gombák világába és a pályafutásom meghatározó, kezdeti lépéseit segítette.

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.

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.

Bevan EA & Markower M (1963) The physiological basis of the killer character in yeast. In *Proc. XIth Int. Congr. Genet*, pp. 202-203.

Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A & Visconti A (2006) Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int J Food Microbiol* **108**, 204-209.

Boekhout T & Scorzetti G (1997) Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* **35**, 147-149.

Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, Dromer F & Meyer W (2001) Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **147**, 891-907.

Bold HC (1957) *The Morphology of Plants*. New York: Harper Row.

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.

Bortol A, Nudel C, Fraile E, Torres R, Giulietti A, Spencer JFT & Spencer D (1986) Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology* **24**, 414-416.

Breinig F, Schleinkofer K & Schmitt MJ (2004) Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology* **150**, 3209-3218.

Breinig F, Sendzik T, Eisfeld K & Schmitt MJ (2006) Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3810-3815.

Breinig F, Tipper DJ & Schmitt MJ (2002) Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* **108**, 395-405.

Buntjer J.B. (2001) Phylogenetic Computer Tools. The Netherlands: Wageningen University.

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 Microbiol Lett* **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 Res* **7**, 749-760.

Carlile MJ, Watkinson SC & Gooday GW (2004) Fungal Diversity. In *The Fungi*, pp. 11-84. London: Elsevier Academic Press.

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. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2595-2602.

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. *J Appl Microbiol* **99**, 609-617.

De Mot R & Verachtert H (1985) Purification and Characterization of Extracellular Amylolytic Enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum. Appl Environ Microbiol* **50**, 1474-1482.

De Mot R & Verachtert H (1987) Regulation of the amylase secretion by the yeast *Filobasidium capsuligenum* and a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**, 258-262.

Eisfeld K, Riffer F, Mentges J & Schmitt MJ (2000) Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol* **37**, 926-940.

Ellis D & Pfeiffer T (1992) The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol* **8**, 321-325.

Emmos CW (1955) Saprophyc sources of *Cryptococcus neoformans* associated with pigeon. pp. 227-252.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A & Sampaio JP (2001) Basidiomycetous yeasts. In *The Mycota. Vol. VII. Part B, Systematics and Evolution.*, pp. 3-35 [DJ McLaughlin, EJ McLaughlin, and PA Lemke, editors]. Berlin: Springer-Verlag.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G & Statzell-Tallman A (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 3**, 1351-1371.

Fell JW, Roeijmans H & Boekhout T (1999) *Cystofilobasidiales*, a new order of basidiomycetous yeasts. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**, 907-913.

Fell JW, Statzell AC, Hunter IL & Phaff HJ (1969) *Leucosporidium gen. n.*, the heterobasidiomycetous stage of several yeasts of the genus *Candida. Antonie Van Leeuwenhoek* **35**, 433-462.

Felsenstein J (2004) PHYLIP version 3.65. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seatttle, WA 98195-7730, USA.

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.

Gácser A, Hamari Z, Pfeiffer I, Varga J, Kevei F & Kucsera J (2001) Genetic diversity in the red yeast *Cryptococcus hungaricus* and its phylogenetic relationship to some related basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* **1**, 213-220.

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.

Golubev WI & Boekhout T (1995) Sensitivity to killer toxins as a taxonomic tool among heterobasidiomycetous yeasts. **38**, 47-58.

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*). *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 905-911.

Golubev WI & Golubeva EW (2004) Yeast fungi in steppe and forest phytocenoses of the Prioksko-terrasny biosphere reserve. **38**, 20-27.

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

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

Golubev WI, Kuznetsova L & . (1991) The taxonomic specificity of the action spectrum of *Filobasidium capsuligenum* mycocin. *Microbiology (in Russian)* **60**, 530-536.

Golubev WI & Shabalin Y (1994) Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiol Lett* **119**, 105-110.

Goto K, Iwatuki Y, Kitano K, Obata T & Hara S (1990) Cloning and nucleotide sequence of the KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem* **54**, 979-984.

Guarro J, GeneJ & Stchigel AM (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **12**, 454-500.

Gunge N, Tamaru A, Ozawa F & Sakaguchi K (1981) Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J Bacteriol* **145**, 382-390.

Hawksworth DL (2006) Pandora's mycological box: molecular sequences vs. morphology in understanding fungal relationships and biodiversity. *Rev Iberoam Micol* **23**, 127-133.

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

Heard GM & Fleet GH (1987) Occurrence and Growth of Killer Yeasts during Wine Fermentation. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2171-2174.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF*, et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**, 509-547.

Hutchins K & Bussey H (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol* **154**, 161-169.

Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y & Kaufman L (1982) Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* **16**, 22-29.

Izgu F & Altinbay D (2004) Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo-beta-1,3-glucanase. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 685-693.

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.

Jablonowski D & Schaffrath R (2007) Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochem Soc Trans* **35**, 1533-1537.

Joerger RD (2003) Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci* **82**, 640-647.

Johnson EA (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol* **6**, 169-174.

Kabasawa K, Itagaki H, Ikeda R, Shinoda T, Kagaya K & Fukazawa Y (1991) Evaluation of a new method for identification of Cryptococcus neoformans which uses serologic tests aided by selected biological tests. *J Clin Microbiol* **29**, 2873-2876.

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

Karamysheva ZN, Ksenzenko VN, Golubev WI, Ratner EN & Tikhomirova LP (1991) Characterization of viruses in the mycocinogenic strain of *Cystofilobasidium bisporidii* VKM Y-2700. pp. 376-378.

Katsu M, Kidd S, Ando A, Moretti-Branch, Mikami Y, Nishimura K & Meyer W (2004) The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Res* **4**, 377-388.

Kevei F, Kucsera J, Varga J & Vágvölgyi Cs (1999) *Fejezetek a mikológiából*. Szeged: JATEPress.

Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A & Mundy LM (2007) Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* **35**, 51-58.

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.

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 Res* **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.

Koltin Y, Levine R & Peery T (1980) Assignment of functions to segments of the DsRNA genome of the *Ustilago* virus. *Mol Gen Genet* **178**, 173-178.

Kwon-Chung KJ (1998a) *Filobasidiella* Kwon-Chung. In *The Yeasts (Fourth Edition).*, pp. 663-669 [Cletus PK and Jack WF, editors]. Amsterdam: Elsevier.

Kwon-Chung KJ (1998b) *Filobasidium Olive*. In *The Yeasts (Fourth Edition).*, pp. 663-669 [Cletus PK and Jack WF, editors]. Amsterdam: Elsevier.

Kwon-Chung KJ (1976) A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* **68**, 943-946.

Leach J, Finkelstein DB & Rambosek JA (1986) Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. *Fungal Gen Newslett* **33**, 32-33.

Lesage G & Bussey H (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 317-343.

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.

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.

Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D & Polonelli L (1997) Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* **10**, 369-400.

Matheny PB, Wang Z, Binder M, Curtis JM, Lim YW, Nilsson RH, Hughes KW, Hofstetter V, Ammirati JF, Schoch CL, Langer E, Langer G, McLaughlin DJ, Wilson AW, Froslev T, Ge ZW, Kerrigan RW, Slot JC, Yang ZL, Baroni TJ, Fisher M, Hosada K, Matsuura K, Seidl MT, Vauras J & Hibbett DS (2007) Contributions of rpb2 and tef1 to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Mol Phylogenet Evol* **43**, 430-451.

McFadden D, Zaragoza O & Casadevall A (2006) The capsular dynamics of Cryptococcus neoformans. *Trends in Microbiology* **14**, 497-505.

McNeil F, Barrie F, Burdet HM, Demoulin V, Hawksworth DL, Marhold K, Nicolson DH, Prado J, Silva PC, Skog JE, Wiersema J & Turland NJ (2006) *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) [Regnum Vegetabile Vol. 146.]*. Ruggell: A.R.G. GanterVerlag.

Meray J (2000) Szisztemas gombas fertozesek az intenziv osztalyon. In *Az orvosi mikologia gyakorlati kerdesei* [A Szakja and G Simon, editors]. Budapest: Golden Book Kiado.

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.

Middelbeek EJ, Hermans JM & Stumm C (1979) Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **45**, 437-450.

Mitchell TG & Perfect JR (1995) Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* **8**, 515-548.

Mizutani A, Hagiwara H & Yanagisawa K (1990) A killer factor produced by the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. *Archives of Microbiology* **153**, 413-416.

Moore RT (1980) Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts. *Botanical Marina* **23**, 361-373.

Nissen-Meyer J & Nes IF (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol* **167**, 67-77.

Palpacelli V, Ciani M & Rosini G (1991) Activity of different 'killer' yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol Lett* **68**, 75-78.

Pan L, Huang YW, Ye YR & Wang YQ (2007) A model for screening anti-viral agents based on yeast killer system. *Wei Sheng Wu Xue Bao (in Chinese)* **47**, 517-521.

Peery T, Shabat-Brand T, Steinlauf R, Koltin Y & Bruenn J (1987) Virus-encoded toxin of *Ustilago maydis*: two polypeptides are essential for activity. *Mol Cell Biol* **7**, 470-477.

Perfect JR, Ketabchi N, Cox GM, Ingram CW & Beiser CL (1993) Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* **31**, 3305-3309.

Peterson SW & Kurtzman CP (1991) Ribosomal-RNA Sequence Divergence Among Sibling Species of Yeasts. *Systematic and Applied Microbiology* **14**, 124-129.

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

Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Castagnola M, Morace G & Chezzi C (1991) 'Antibiobodies': antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol* **29**, 235-242.

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

Polonelli L, Seguy N, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Cantelli C, Magliani W & Cailliez JC (1997) Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**, 142-146.

Preer JR, Jr. & Preer LB (1967) Virus-like bodies in killer *paramecia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1774-1781.

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.

Riffer F, Eisfeld K, Breinig F & Schmitt MJ (2002) Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **148**, 1317-1328.

Rodrigues de Miranda L (1972) *Filobasidum capsuligenum* nov. comb. *Antonie Van Leeuwenhoek* **38**, 91-99.

Romanos MA, Scorer CA & Clare JJ (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488.

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

Sampaio JP, Gadanho M, Santos S, Duarte FL, Pais C, Fonseca A & Fell JW (2001) Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus Rhodosporidium: Rhodosporidium kratochvilovae and related anamorphic species. *Int J Syst Bacteriol* **51**, 687-697.

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

Schaffrath R & Breunig KD (2000) Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol* **30**, 173-190.

Schlaich T, Urbaniak B, Plissonnier ML, Malgras N & Sautter C (2007) Exploration and Swiss field-testing of a viral gene for specific quantitative resistance against smuts and bunts in wheat. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **107**, 97-112.

Schmitt M & Radler F (1987) Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol* **133**, 3347-3354.

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

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.

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

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 Immunol Med Microbiol* **22**, 145-149.

Selitrennikoff CP (2001) Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2883-2894.

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

Silva daS, Calado S, Lucas C & Aguiar C (2007) Unusual properties of the halotolerant yeast Candida nodaensis Killer toxin, CnKT. *Microbiol Res*.

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.

Starmer WT, Ganter PF, Aberdeen V, Lachance MA & Phaff HJ (1987) The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol* **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.

Stratford M (1994) Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast* **10**, 1741-1752.

Stumm C, Hermans JM, Middelbeek EJ, Croes AF & de Vries GJ (1977) Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek* **43**, 125-128.

Suzuki C & Nikkuni S (1994) The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J Biol Chem* **269**, 3041-3046.

Szécsi Á, Érsek T & Varga J (2003) A gombák filogenetikai rendszere. In *Mikológia*, 71-138 [Jakucs E and Vajna L., editors]. Budapest: Agroinform Kiadó.

Takasuka T, Komiyama T, Furuichi Y & Watanabe T (1995) Cell wall synthesis specific cytocidal effect of Hansenula mrakii toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* **41**, 575-581.

Tao J, Ginsberg I, Banerjee N, Held W, Koltin Y & Bruenn JA (1990) *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins. *Mol Cell Biol* **10**, 1373-1381.

Tehler A (1988) A cladistic outline of the *Eumycota*. *Cladistics* **4**, 227-277.

Theisen S, Molkenau E & Schmitt MJ (2000) Wicaltin, a new protein toxin secreted by the yeast *Williopsis californica* and its broad-spectrum antimycotic potential. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**, 547-550.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.

Thornton RJ (1986) Genetic characterisation of New Zealand and Australian wine yeasts. Occurrence of killer systems and homothallism. *Antonie Van Leeuwenhoek* **52**, 97-103.

Tintelnot K, Schar G & Polak A (2001) Epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland: part of the ECMM survey in Europe. European Confederation of Medical Mycology. *Mycoses* **44**, 345-350.

Tipper DJ & Bostian KA (1984) Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol Rev* **48**, 125-156.

Tokunaga M, Kawamura A, Yonekyu S, Kishida M & Hishinuma F (1993) Secretion of mouse alpha-amylase from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: presence of chymostatin-sensitive protease activity in the culture medium. *Yeast* **9**, 379-387.

van der Walt J & van Kerken A (1961) Three new anascosporogenous yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **27**, 206-212.

Vilgalys R (1998) Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhiyoctonia* as measured by DNA/DNA hybridisation. *Phytopathology* **78**, 698-702.

Wang X, Chi Z, Yue L, Li J, Li M & Wu L (2007) A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. *Microbiol Res* **162**, 77-85.

White TJ, Burns T., Lee S. & Taylor J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.*, pp. 315-322 [Gelfand M.A.D.H., Sninsky J.J., and White T.J., editors]. New York: Academic Press,Inc.

Wickes B & Kwon-Chung JK (2002) Genetic Basis of Pathogenicity in *Cryptococcus neoformans*. In *Fungal Pathogenesis Principles and Clinical Applications*, pp. 25-51 [RA Calderone and RL Cihlar, editors]: Marcel Dekker.

Wickes BL, Mayorga ME, Edman U & Edman JC (1996) Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7327-7331.

Wickner RB (1989) Yeast virology. *FASEB J* **3**, 2257-2265.

Wickner RB (1996) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **60**, 250-265.

Wickner RB, Bussey H, Fujimura T & Esteban R (1995) Viral RNA and the killer phenomenon of *Saccharomyces*. In *The Mycota, Genetics and Biotechnology*, pp. 211-226 [Kuck, editor]. Berlin: Springer Verlag.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**, 6531-6535.

Woods DR & Bevan EA (1968) Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **51**, 115-126.

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

Yamamoto H (1991) Protease. (Hyogo, JP) United States, Res MD. (JP), 5053333.

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

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

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.

9. Függelék

9.1. Toxintermelésre, ill. FC-1 toxinnal szembeni érzékenységre vizsgált élesztő törzsek

0023 Champ. mensil (pezsgő)
0024 Champ. cramant (pezsgő)
0026 Ay Versay (pezsgő)
0027 10 (pezsgő)
0028 Steringerg 1982 (pezsgő)
0029 Steringerg 1893 (pezsgő)
0031 Openheimer 1894 (pezsgő)
0032 Bouzy poros (pezsgő)
0035 *Dipodascus tothii*
*0052 *Hansenula anomala*
0054 *Saccharomyces cerevisiae*
0152 *Schizosaccharomyces pombe* (mutáns, 0142)
0160 *Schizosaccharomyces pombe* (wt, h^+)
0162 *Schizosaccharomyces pombe* (mutáns)
0169 *Saccharomyces cerevisiae* UV 12 (mutáns, 0165)
0171 *Saccharomyces cerevisiae* UV 17 (mutáns, 0165)
0172 *Saccharomyces cerevisiae* 207 fehér (mutáns, 0174)
0173 *Saccharomyces cerevisiae* Moszk. T1
0174 *Saccharomyces cerevisiae* Y form p.
0175 *Saccharomyces cerevisiae* Y form. g.
0381 *Schizosaccharomyces acidodevaratus*
0382 *Schizosaccharomyces mosquensis*
0383 *Shizosaccharomyces pombe*
0385 *Shizosaccharomyces malidevarans*
0391 *Saccharomyces cerevisiae*
0392 *Saccharomyces cerevisiae*
0395 *Saccharomyces cerevisiae*
0399 *Saccharomyces cerevisiae*
0407 *Saccharomyces cerevisiae*
0408 *Saccharomyces cerevisiae*
0413 *Schizosaccharomyces octosporus*
0417 *Saccharomyces kluyveri*
0419 *Saccharomyces cerevisiae* (CCY 21-9-1)
0425 *Saccharomyces cerevisiae*
0426 *Saccharomyces cerevisiae* (mutáns, 0425)
0426P1 *Saccharomyces cerevisiae*
0426P2 *Saccharomyces cerevisiae*
0427 *Saccharomyces cerevisiae*
0428 *Saccharomyces cerevisiae*
0431 *Saccharomyces cerevisiae*
*0438 *Saccharomyces cerevisiae*
0439 *Saccharomyces cerevisiae*
0448 *Saccharomyces cerevisiae*
0449 *Saccharomyces cerevisiae*
0451 *Saccharomyces cerevisiae*
0453 *Saccharomyces cerevisiae*
0454 *Saccharomyces,* Dreher
0455 *Saccharomyces,* Sa Ke

0457 *Saccharomyces,* Somlyó 2
0459 *Saccharomyces,* Eger 1
0460 *Saccharomyces,* Tokaj 13
0461 *Saccharomyces,* Tokaj 22
0463 *Saccharomyces,* Kecskemét 5
0466 *Saccharomyces,* leningrádi hideg
0467 *Saccharomyces,* burgonya
0468 *Saccharomyces,* Hideg 1985
0469 *Saccharomyces*, pékélesztő
0621 *Schizosaccharomyces pombe* (mutáns, 0142)
0633 *Schizosaccharomyces pombe* (mutáns, 0142)
0635 *Saccharomyces,* Romanestyi
0636 *Saccharomyces,* Tolcsva édes
0641 *Saccharomyces ovarum*
0642 *Saccharomyces logos*
0644 *Saccharomyces cerevisiae*
0646 *Saccharomyces cerevisiae*
0647 *Saccharomyces cerevisiae*
0650 *Saccharomyces cerevisiae*
0653 *Schizosaccharomyces pombe*
0663 *Saccharomyces cerevisiae*
0667 *Saccharomyces cerevisiae* GRC3
0668 *Saccharomyces cerevisiae* GRC5
0669 *Saccharomyces cerevisiae* GRC6
0670 *Saccharomyces cerevisiae* GRC8
0672 *Saccharomyces cerevisiae* his^-
0673 *Candida boidinii*
0676 *Candida sp.*
0678 *Candida sp.*
0679 *Candida sp.*
0680 *Candida boidini*
0681 *Saccharomyces cerevisiae*
0682 *Hansenula philodendia*
0684 *Torulopsis pignaliae*
0685 *Hansenula anomala var. ohnegii*
0687 *Saccharomyces cerevisiae*
0688 *Saccharomyces cerevisiae*
0690 *Zygosaccharomyces cavarae-benuveri*
0692 *Zygosaccharomyces polymorphus*
0703 *Schizosaccharomyces octosporus* (CCY 44-2-1)
0704 *Saccharomyces cheyalieri* (CCY 21-11-1)
0707 *Saccharomyces rouxii*
0709 *Saccharomyces heterogenius*
0710 *Saccharomyces ellipsoideus*
0711 *Saccharomyces oviformis-xeres*
0712 *Saccharomyces oviformis massandra*
0715 *Saccharomyces paradoxus*
0716 *Saccharomyces chodati*
0718 *Saccharomyces pasteurianus*
0719 *Saccharomyces exiquus*
0721 *Debaromyces tyrocola*
0727 *Hansenula beijerinckii*
0742 *Dipodascus geotrichum* (CBS 775.71)
0748 *Sporobolomyces pararoseus*
0751 *Nematospora gossipy*
0774 *Candida mycoderma* (CCY 29-39-2)

0775 *Candida mycoderma* (CCY 29-39-4)
0776 *Azymocandida corniculata*
0777 *Candida aaseri*
0778 *Candida rugosa* (CCY 24-15-1, CBS 613)
0779 *Candida krusei*
0780 *Candida flareri*
0781 *Candida farmata*
0786 *Candida pseudo-tropicalis*
0793 *Candida pulcherrima*
0794 *Candida pulcherrima*
0795 *Candida pulcherrima*
0796 *Candida pulcherrima*
0797 *Candida pulcherrima*
0798 *Candida pulcherrima*
0799 *Candida quilliermondi*
0800 *Candida quilliermondi*
0802 *Candida quilliermondi*
0804 *Candida quilliermondi*
0805 *Candida quilliermondi*
0812 *Candida quilliermondi*
0817 *Torulopsis cantarreli*
0818 *Torulopsis stellata*
0820 *Torulopsis vanzylii*
0821 *Torulopsis westerdijkii*
0823 *Cryptococcus laurentii*
0825 *Paratorulopsis pseudaerina* (CCY 25-6-1)
0826 *Nigrococcus nigricans*
*0828 *Cryptococcus albidus*
0830 *Rhodotorula rubra*
0831 *Rhodotorula mucilaginosa*
0832 *Rhodotorula mucilaginosa*
0833 *Rhodotorula minuta*
0834 *Rhodotorudla flava*
0835 *Rhodotorula sloffii*
0836 *Rhodotorula texensis*
0837 *Rhodotorula zsoltii*
0838 *Rhodotorula*, E/3
0839 *Rhodot glutinis*
0840 *Rhodot glutinis* F
0841 *Rhodot glutinis* E
0843 *Rhodot glutinis* L (CCY 20-13-1)
0844 *Rhodot glutinis* M
0845 *Rhodot glutinis* O (CCY 20-13-6)
0846 *Dioszegia hungarica*
0858 *Nadsonia elongata* (CCY 36-3-1)
0861 *Saccharomyces cerevisiae*
0862 *Schizosaccharomyces ludwigii* (CCY-34-1-2)
0863 *Trigonopsis variabilis*
0864 *Trigonopsis variabilis*
0865 *Schizosaccharomyces pombe* (CCY 44-1-3)
0880 *Schizosaccharomyces pombe* (mutáns, 0161)
0882 *Schizosaccharomyces pombe* (mutáns, 0161)
0893 *Schizosaccharomyces pombe* (mutáns, 0161)
0915 *Hansenula sp.*

0923 *Saccharomyces cerevisiae*
0942 Pru1 (Kuba, sörélesztő)
0943 Pru5 (Kuba, sörélesztő)
0946 6. D (Kuba, tengeri hal)
0948 *Rhodotorula*, C.
0988 Metanolos élesztő
1013 *Ashbia grossypii*
1015 *Endomycopsis ovetensis*
1024 *Metschnikowia pulcherrima* (CBS 5833)
1026 *Candida lipolytica* (CBS 6124-1)
1027 *Kloecheria apiculata*
1029 *Candida lambica* (CBS 1876)
1033 *Candida lipolytica* (CBS 6124-1)
1039 *Candida zeylanoides* (CBS 4909)
1046 *Candida vartioraaria* (CBS 4290)
1047 *Candida pseudotropicalis*
1051 *Pichia membranaefaciens* (CBS 5557)
*1052 CBS 5558 *Pichia membranaefaciens* (CBS 5558)
1055 *Saccharomyces cerevisiae* (CBS 432)
1056 *Schizosaccharomyces pombe* (CBS 356)
1057 *Hanseniospora valbyensis* (CBS 479)
1058 *Hansenula anomala var. anomala* (CBS 5759)
*1064 *Rhodotorula rubra* (CBS 17)
1065 *Debaromyces hansenii* (CBS 356)
*1066 *Debaromyces hansenii*(CBS 767)
1072 *Lodderomyces elongasporus* (CBS 2605)
1075 *Schizosaccharomyces pombe* ade$^-$ (mutáns, 0160)
1076 *Schizosaccharomyces pombe* his$^-$ (mutáns, 0160)
1077 *Schizosaccharomyces pombe* his$^-$ (mutáns, 0160)
1078 *Schizosaccharomyces pombe* his$^-$ (mutáns, 0160)
1079 *Schizosaccharomyces pombe* his$^-$ (mutáns, 0160)
1080 *Schizosaccharomyces pombe* ura$^-$ (mutáns, 0160)
1082 *Schizosaccharomyces pombe* lys$^-$ (mutáns, 0160)
1138 *Schizosaccharomyces pombe* ade$^-$ his$^-$ (0163x1079)
1139 *Schizosaccharomyces pombe* ade$^-$ his$^-$ (0163x1079)
1140 *Schizosaccharomyces pombe* ade$^-$ his$^-$ (0163x1079)
1144 *Schizosaccharomyces pombe* ade$^-$ his$^-$ (0163x1079)
1145 *Schizosaccharomyces pombe* ade$^-$ his$^-$ (0163x1079)
1147 *Schizosaccharomyces pombe* ade$^-$ his$^-$ (0163x1079)
1150 *Saccharomyces cerevisiae ura*$^-$ (mutáns 0425-ből)
1197 *Rhodosporidium toruloides* (CCY 62-2-7α)
*1208 *Candida krusei* (IFM 46834)

*1223 *Kluyveromyces lactis* (WM 37)	1225 *Kluyveromyces lactis*
1224 *Kluyveromyces lactis*	1226 Kluyveromyces lactis

Az első szám a Szegedi Egyetem Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményének (SzMC nyilvántartásának felelnek meg. A más törzsgyűjteményből származó törzsek esetében az eredeti törzsszámot is feltüntettük.

Egyéb, érzékenységre vizsgált törzsek:

Cystofilobasidium bisporidii VKM Y-2700
**Cryptococcus podzolicus* VKM Y/2249
Cryptococcus albidus IFO 378
**Cryptococcus laurentii* VKM Y/1665
Candida albicans ATCC 10231

Az aláhúzással jelölt törzsek érzékenyek voltak a toxinra. A csillaggal jelölteket minden termelő törzs toxinjára megvizsgáltuk.

9.2. Általunk izolált *Cryptococcus* törzsek

MINTA SZÁM	FAJ	SZÁRMAZÁSI HELY	NITRIT ASSZIMI-LÁCIÓ	TOK	MATING	CRYPTO CHECK NO1	CRYPTO CHECK (SZERO-TÍPUS)	TOXIN-ÉRZÉKENY-SÉG
H-21	*C. neoformans*	Mohács/1	-	+	α	+	A	+
H-22	*C. neoformans*	Mohács/1	-	+	α	+	A	+
*H-23	*C. neoformans*	Mohács/1	-	+	α	+	D	+
H-25	*C. neoformans*	Mohács/1	-	+	-	+	D	+
H-26	*C. neoformans*	Mohács/1	-	+	α	+	D	+
H-27	*C. neoformans*	Mohács/1	-	+	α	+	D	+
*H-28	*C. neoformans*	Mohács/2	-	+	α	+	A	+
*H-30		Szeged	+	-		+	C	+
H-31		Szeged	+	-	-	+	A	-
H-32		Szeged	+	-		+	C	+
H-33		Szeged	+	-		+	C	+
H-34		Szeged	+	-		+	C	+
H-35		Szeged	+	-		+	C	+
H-36		Szeged	+	-		+	C	+
H-37		Szeged	+	-		+	C	+
H-38		Szeged	+	-		+	C	+
H-39	*C. neoformans*	Mohács/3	-	+	α	+	D	+
H-40	*C. neoformans*	Mohács/3	-	+	α	+	D	+
H-43		Répcelak	+	+	-	+	A	-
H-44		Répcelak	+	+	-	+	A	-
H-45		Répcelak	+	+	-	+	A	-
H-47		Répcelak	+	+	-	+	A	-
H-49		Répcelak	+	+	-	+	A	-
H-56		Klinika-sz	+	+	-	+	A	-
H-60 60457a	*C. neoformans*	Beteg	-	+	α	+	A	+
*H-62 62680b	*C. neoformans*	Beteg	-	+	α	+	A	+
*H-63 60279b	*C. neoformans*	Beteg	-	+	α	+	A	+
H-64	*C. albidus*	Tömörk./2	+	+	-		A	-
H-67	*C. albidus*	Mohács/6	+	-	-		A	-
H-71	*C. albidus*	Mohács/6	+	+	-		A	-
*H-72	*C. albidus*	Mohács/6	+	+	-		A	-
H-73	*C. albidus*	Mohács/6	+	+	-		A	-
H-74	*C. albidus*	Mohács/6	+	-	-		A	-
H-75	*C. albidus*	Mohács/6	+	-	-		A	-
H-80	*C. albidus*	Mohács/B	+	+	-		A	-
H-81	*C. albidus*	Mohács/B	+	+	-		A	-
H-82	*C. albidus*	Mohács/B	+	+	-		A	-
H-83	*C. albidus*	Mohács/B	+	+	-		AD	-
H-84	*C. albidus*	Mohács/B	+	+	-		A	-

H-85	*C. albidus*	Szeged/K	+	+	-		A	-
H-86	*C. albidus*	Szeg./kpa	+	+	-		AD	-
H-87	*C. albidus*	Szeg./kpa	+	+	-		A	-
H-90	*C. albidus*	Ajka/3	+	+	-		A	-
H-93	*C. neoformans*	Szentes/2		+	α		D	+
H-94	*C. neoformans*	Szentes/2		+	α		A	+
H-95	*C. neoformans*	Szentes/2		+	α		D	+
H-96	*C. neoformans*	Szentes/2		+	**a**		D	+
H-97	*C. neoformans*	Szentes/2		+	α/**a**		D	+
H-98	*C. neoformans*	Szentes/2		+	α		D	+
H-99	*C. neoformans*	Szentes/2		+	α		D	+
H-100	*C. neoformans*	Szentes/2		+	α		D	+
*353/2004		Beteg						+
*2679/2003		Beteg						+
*2710/2003		Beteg						+
*60203A		Beteg						+
*60209C		Beteg						+
*60467B		Beteg						+
*62680A		Beteg						+
*62680C		Beteg						+

A betegből izolált mintákat kivéve, minden izolátum galambürülékből származott. A csillaggal jelölt törzseket mind a négy termelő *F. capsuligenum* toxinjára megvizsgáltuk, míg a többi esetében a toxinérzékenységet csak IFM 40078 törzzsel szemben teszteltük.

9.3. FC-1 toxin érzékenységre vizsgált fonalas gombák

1416 *Neurospora crassa*
0049 *Actinomucor repens*
0047 *Syncephalastrum racemosum*
Rhizopus racemosum
0531 *Penicillium frequentas*
Mucor rouxii
0550 *Mucor genevensis*
1408 *Mucor hiemalis*
0885 *Aspergillus flavus*
0551 *Aspergillus violaceus*
0514 *Penicillium chrysogenum*
1110x1107 *Aspergillus nidulans diploid*
0558 *Penicillium purpurogenum*
Penicillium claviforme
0549 *Aspergillus albertensis*
1069 *Penicillium sp.*
0556 *Penicillium ramigena*
Trichoderma harzianum
Sordaria fimicola
0049 *Actinomucor repens*
0471 *Mycothypha spirifera*
F. proliferatum
0547 *Thamnostyllum piriforme*
0050 *Aspergillus niger 65 (ATCC 22343)*
0519 *Penicillium ramigenosum*
0552 *Aspergillus nidulans WT 0307*
0123 *Aspergillus niger*
1107 *Aspergillus nidulans*
1110 *Aspergillus nidulans*
0932 *Aspergillus niger*