

**Saccharomyces fajok légzésdeficiens
mutánsainak előállítása és összeha-
sonlító vizsgálata**

Doktori értekezés

**Készült a József Attila Tudomány-
egyetem Mikrobiológiai Tanszékén
Szegeden, 1976-ban**

Készítette: Maráz Anna Mária



ÖSSZEFOGLALÁS

A fakultatív anaerob élesztőgombáknál két, egymástól viszonylag független energiatermelő rendszer működik. Az egyik az aerob légzés, a másik pedig az anaerob körülmények között funkcionáló alkoholos erjesztés. A légzési mechanizmus működése a mitokondriumok teljes épségét követeli meg, ehhez pedig elengedhetetlen a mitokondriális DNS által kódolt fehérjék jelenléte. A mitokondriális DNS mutációja tehát, főként a *Saccharomyces* genus különböző fajainál respiráció deficiens /RD/, másnéven petite mutánsok megjelenéséhez vezet, melyek cytoplazmatikus öröklésmentet mutatnak.

Kísérleteim során különböző *Saccharomyces* típusú élesztőkben /*Saccharomyces cerevisiae* XI687-16C, S288c, RXII, S. diastaticus, logos és uvarum/ respiráció deficiens mutáció kiváltásának lehetőségét vizsgáltam. A mutánsindukció két, egymástól lényegesen eltérő hatásmechanizmus alapján történt:

1. A mitokondriális fehérjeszintézis szelektív gátlása riboszomális szinten ható antibakteriális antibiotikumokkal. A chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, gentamycin, kanamycin, neomycin, valamint az oxytetracyclin és chlortetracyclin mutánsindukáló képességét vizsgáltam az antibiotikumok koncentrációjának és hatásidejének függvényében. Az eredmények szerint^a hatékony antibiotikumok /erythromycin, neomycin, oxytetracyclin és chlortetracyclin/ viszonylag magas, a baktériumok növekedésének gátlásához szükséges koncentrációnál 3-4 nagyságrenddel nagyobb koncentrációban képesek RD-mutáció indukálására. A mutációs arány azonban extrém

magas, törzstől és antibiotikumtól függően sokszor a 100%-ot is eléri.

Leghatékonyabbnak az erythromycin, oxytetracyclin és chlortetracyclin bizonyult, melyek valamennyi vizsgált törzsnél 100% körüli RD-mutációt indukáltak 2-4 napos kezelési idő alatt.

2. Cytoplazmatikus RD-mutáció indukálható közvetlenül a mitokondriális DNS szelektív károsításával, melyre alkalmas az etidiumbromid. Mutagén hatását a mitokondriális DNS-be történő interkalációja révén fejti ki, a szükséges koncentráció kb. 3 nagyságrenddel kisebb, mint az antibakteriális antibiotikumok alkalmazása esetén. Valamennyi vizsgált élesztőtörzsnél 100% mutációs gyakoriságot eredményezett 1-3 napos inkubációs idő alatt.

Kísérleteim során megvizsgáltam a leghatékonyabb RD mutáns induktornak bizonyult anyagok, az erythromycin, oxytetracyclin chlortetracyclin és az etidiumbromid hatását nyolc, eddig petite negatívként ismert élesztőnél is. Mutációt azonban ezekkel az anyagokkal sem sikerült egyik törzsnél sem indukálni.

Az erythromycinnel és chlortetracyclinnel indukált petite mutánsok sejtmag és mitokondriális DNS-ét fluoreszcens festék/CsCl fajsúlygrádiensben szeparálva megvizsgáltam, milyen változások történtek a mitokondriális DNS mennyiségében ill. fajsúlyában. A *Saccharomyces cerevisiae* S288c törzs petite mutánsai közül sem az erythromycinnel, sem a chlortetracyclinnel indukált mutánsok nem tartalmaztak kimutatható mennyiségben mitokondriális DNS-t, ezek ún. $\varnothing$ mutánsok voltak. A többi megvizsgált petite törzs mind tartalmazott mitokondriális DNS-t, melynek

fajsúlya vagy azonos volt a grande-ével vagy annál kisebb volt, az eltérés azonban még azonos grande anyagtörzs esetén is különböző volt. Ezek un. S^- mutánsok voltak.

Ugy tűnik tehát, hogy a petite mutánsoknál a mitokondriális DNS degradációjának mértéke nem elsősorban az alkalmazott induktortól függ, sokkal inkább az illető élesztőtörzs mitokondriális DNS-ének stabilitásától ill. labilitásától.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés

1. A cytoplazmatikus légzésdeficiens mutánsok jellemzői...
2. A fehérjeszintézisgátló antibakteriális antibiotikumok hatása a bakteriális és mitokondriális fehérjeszintézisre.....
3. Az etidiumbromid hatása az élesztőgombák mitokondriális rendszerére.....
4. A cytoplazmatikus petite mutánsok mitokondriális DNS-ének jellemzői.....

Anyagok és módszerek

1. Törzsek.....
2. Táptalajok.....
3. Antibiotikumok.....
4. Inkubáció.....
5. Antibiotikumos kezelés.....
6. Az RD-mutáció kimutatására alkalmazott módszerek.....
7. Élesztők sejtmag és mitokondriális DNS-ének elválasztása festék/CsCl fajsúlygrádiens centrifugálással.....

Eredmények ismertetése

1. A chloramphenicol, erythromycin, streptomycin és oxytetracyclin RD-mutáns induktor aktivitása a *Saccharomyces cerevisiae* két törzsébe, folyadékos tenyészetben...
2. Antibakteriális antibiotikumok RD-mutáns induktor hatásának vizsgálata a felületen történő tenyésztés módszerével.....
3. Az etidiumbromid RD-mutáns indukáló hatékonysága különböző *Saccharomyces* fajoknál.....
4. Antibiotikumokkal indukált, TV redukcióra képtelen telepek szénforráshasznosítása.....

5. Petite negatív élesztők reagálása az antibiotikus és etidiumbromidos kezelésre.....	
6. Különböző Saccharomyces fajok petite mutánsainak összehasonlítása a mitokondriális DNS tartalom alapján.....	
Eredmények értékelése.....	
Irodalom.....	
Képmellékletek.....	

BEVEZETÉS

1. A citoplazmatikus légzés-deficiens mutánsok jellemzői

A citoplazmatikus légzés-deficiens /röviden RD/ - mutánsok az extrakromoszomális mutánsok egyik sajátos csoportját alkotják. Mint az elnevezés mutatja, ezek a sejtek légzésre /respirációra/ képtelenek. Az RD mutáció azoknál az eukarióta sejteknél, ahol a légzési mechanizmus mellett más energiatermelő rendszer is működik, nem letális. Ilyenek az un. erjesztő élesztőgombák, ahol két, egymástól viszonylag független energiatermelő rendszer működik, az egyik az aerob légzés, a másik pedig az anaerob körülmények között funkcionáló alkoholos erjesztés. Mivel a glükóz fermentációja során lényegesen kevesebb energia keletkezik, mint légzésnél, a mutáns sejtek szaporodása lassabb lesz, ami aerob körülmények között alacsony glükóztartalmú /1-2%/ táptalajon kisebb telepek megjelenésében nyilvánul meg. A mutánsoknak a vad sejtektől eltérő fenotipikus megjelenése vezetett a mutáció felfedezéséhez /Ephrussi 1953/, és ezt tükrözi a "petite colonie" elnevezés is szemben a vad, "grande" telepekkel.

Az RD-mutánsoknál a fenotipikus eltérésen kívül jól karakterizálható fiziológiai, biokémiai és genetikai jellemzőket tártak fel, ami a mutánsok diagnosztizálását könnyebbé és biztosabbá teszi.

Az előzőekből következik, hogy az RD-mutánsok olyan táptalajon, amely kizárólag oxidatív lebontás útján hasznosítható szénforrást tartalmaz, nem képesek szaporodni /Morita és Mifuchi 1970/.

A mutánsok citokróm-spektruma ugyancsak lényegesen eltér a vad típusu sejtektől, citokrómspektrumuk^{ak} a citokróm aa₃ és b teljesen hiányzik /Clark-Walker és Linnane 1966/. Ugyancsak hiányzik a piroszőlősav dehidrogenáz, a citokróm-oxidáz, a NADH-citokróm c oxidoreduktáz és az α -glicerofoszfát

dehidrogenáz /Slonimski 1952/.

A keresztezési kísérletekből kiderült, hogy az RD-mutáció egyfajta extrakromoszomális öröklésmenetet mutat, és a mutációt egy citoplazmatikus un. δ faktorban bekövetkezett változásnak tulajdonították, amely bizonyos enzimek, többek között a Szent-Györgyi-Krebs-ciklus és a terminális oxidáció bizonyos enzimeinek képződését kontrollálja és önálló szaporodási képességgel rendelkezik /Michael és mtsai 1971/. Ez a citoplazmatikus faktor tulajdonképpen a mitokondriális DNS, /továbbiakban mt-DNS/ amely a sejtmag DNS-től függetlenül replikálódik és számos mitokondriális fehérjét és RNS-féleséget kódol /Schatz 1964. Tewari és mtsai 1965, Wintersberger 1965/.

Nemcsak a mt-DNS, hanem maga a mitokondrium is nagyfokú önállósággal rendelkezik a sejten belül, önálló fehérjeszintetizáló rendszere van, amely a citoplazmatikustól sok szerkezeti eltérést mutat. /Linnane és mtsai 1972/. A mitokondriális fehérjeszintetizáló rendszernek saját transzfer-RNS-ei vannak, melyek közül néhányról kimutatták, hogy a mt-DNS kódolja /Casey és mtsai 1974/.

A Saccharomyces-típusú élesztőkben a spontán RD-mutációk gyakorisága más mutációk gyakoriságához képest feltűnően magas, általában 1% körül van, néhány törzsnél azonban ez az arány jóval magasabb is lehet. Különböző fizikai-kémiai ágensek alkalmazása a mutációk arányt lényegesen megnövelheti, sőt bizonyos esetekben ez a 100 %-ot is eléri. Az RD-mutáció indukálásában a leggyakrabban alkalmazott módszerek az akridinfestékekkel, enziminhibitorokkal /Nagai és mtsai 1961/, antibiotikumokkal /Michael és mtsai 1971, - Puglisi és mtsai 1971, Williamson és mtsai 1971/ és etidiumbromiddal /Schwab 1971/ való kezelés, valamint UV-sugárzásnak és magas hőmérsékletnek való kitétel /Nagai és mtsai 1961/.

Bizonyos élesztőtörzsekben eddig spontán RD-mutációkat nem találtak, és az indukciós kísérletek is kudarcot vallottak. Ennek az ún. petite negativitásnak az oka egyelőre ismeretlen, ezek az élesztők valószínűleg stabilisabb mitokondriális rendszerrel rendelkeznek.

2. A fehérjeszintézisgátló antibakteriális antibiotikumok hatása a bakteriális és mitokondriális fehérjeszintézisre

Az élesztőkben levő két, egymástól jól elhatárolt fehérjeszintetizáló rendszer közül az egyik a citoplazmatikus riboszómákhoz kötött, amely az információkat a nucleusból kapja, a másikhoz, a mitokondriális fehérjeszintetizáló rendszerhez az információk egy részét a mt-DNS szolgáltatja. E két genetikai rendszer bonyolult kölcsönhatásban áll egymással és feltehetően különböző regulációs mechanizmusok révén befolyásolják a bennük kódolt genetikai információk megnyilvánulását /Puglisi és mtsi 1971/. A fehérjeszintézis alapvető mechanizmusa a két rendszerben azonos, a résztvevő struktúráis egységek azonban lényeges eltéréseket mutatnak. Legalapvetőbb különbség az, hogy a citoplazmatikus proteinszintetizáló rendszerben 60 S és 40 S alegységből álló 80 S riboszómák vannak, míg a mitokondriális proteinszintetizáló rendszer a baktériumokéhoz hasonlóan 30 S és 50 S alegységekből álló 70 S riboszómákat tartalmaz /Preer 1971/. Ez az eltérés lehetővé teszi a két proteinszintetizáló rendszer antibiotikumokkal való szelektív gátlását. A riboszomális szinten ható fehérjeszintézisgátló antibakteriális antibiotikumok közül egyesek a mitokondriális fehérjeszintézist gátolják anélkül, hogy a citoplazmatikus proteinszintetizáló rendszert befolyásolnák. Ezen antibiotikumok bizonyos koncentrációban a mitokondriális proteinszintézis gátlása révén légzésgátlást

okoznak és csökkentik a nemfermentálható szubsztrátokon való növekedést, magasabb koncentrációban pedig több generációs időn keresztül hatva RD-mutáció indukálására képesek /Clark-Walker és Linnane 1966, Michael és mtsi 1971, Williamson és mtsi 1971, Carnevali és mtsi 1971/. A mutánsindukáló képesség valószínűleg magyarázata az, hogy a mt-DNS replikáció bizonyos, a mitokondriumban szintetizálódó enzimek jelenlétét követeli meg, esetleg a szabályos DNS-replikációhoz elengedhetetlen a mitokondrium membránok integritása. A mitokondriális fehérjeszintézis gátlása révén ezen enzimek, illetve az integritást fenntartó proteinek mennyisége egy kritikus szint alá csökkenhet, ami a mt-DNS elvesztéséhez, csökkenéséhez vagy megváltozásához vezet. Ezek a replikációs faktorok a mitokondriumban általában feleslegben vannak jelen, ezért a mitokondriális proteinszintézis teljes gátlása mellett is több generációs időnek kell eltelni a faktorok kihígulásához /Williamson és mtsi 1971/.

A kísérletek célja az volt, hogy megvizsgáljuk néhány olyan antibakteriális antibiotikum RD-mutáns indukáló hatékonyságát, amelyek a bakteriális fehérjeszintézis riboszómális folyamatainak különböző lépéseinél gátló hatást fejtenek ki. A gátlás mechanizmusa általában feltárt, bár az elsődleges hatások mellett sokszor jelentős mellékhatások is kimutathatók, főleg magasabb antibiotikum koncentrációknál. A bakteriális és mitokondriális fehérjeszintetizáló rendszer nagymérvű szerkezeti hasonlósága alapján azonban feltételezhető, hogy az antibiotikumok hatásmechanizmusa mindkét rendszernél azonos, bár a mitokondriális fehérjeszintézis gátlásához lényegesen magasabb antibiotikum koncentráció szükséges, ami 2-5 nagyságrend eltérés is lehet. Ennek oka egyelőre nem ismeretes. Az egyes antibiotikumok hatásmechanizmusát az 1. ábra, kémiai szerkezetüket pedig a 2. ábra mutatja.

A riboszómális folyamatok inhibitorait két nagy csoportra oszthatjuk aszerint, hogy a 70 S riboszóma 50 S vagy pedig a 30 S alegységéhez kapcsolódva fejtik-e ki a gátló hatást. Ezek az antibiotikumok a riboszóma alegységekkel közvetlen interakcióba lépnek és a riboszóma felületének meghatározott helyéhez specifikus proteinek segítségével kötődnek /Gottlieb és Shaw 1967, Pestka 1971/.

a/ Az 50 S alegységen ható antibiotikumok hatásmechanizmusa

Chloramphenicol /CP/

A CP a baktériumsejtekben specifikusan a riboszómák 50 S alegységéhez kötődik, ezáltal megakadályozza az aminosavaknak a proteinekbe való beépülését. Elsődleges hatása az, hogy gátolja a trNS-hez kapcsolt aminosavak riboszómákon való megkötődését, és ezáltal a peptidkötés kialakulását. Valószínűleg gátló hatást fejt ki a peptidtranszferáz működésére is.

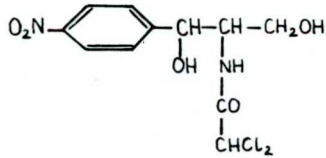
Erythromycin /EM/

Az EM a makrolid antibiotikumok közé tartozik, amelyekre jellemző, hogy 12-22 atomból álló laktongyűrűt tartalmaznak és ehhez egy vagy több cukor kapcsolódik. A ¹⁴C-EM-nel végzett kísérletek azt mutatják, hogy ez az antibiotikum is kizárólag az 50 S alegységhez kötődik, és az E. coli 50 S riboszómájában kimutattak egy proteint, amely az EM kötődésért felelős. Az EM a fehérjeszintézisben ugyanat a lépést gátolja, mint a CP, azaz megakadályozza a peptidkötés kialakulását.

b/ A 30 S alegységen ható antibiotikumok hatásmechanizmusa

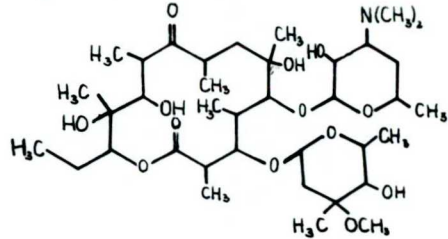
Fehérjeszintézis-gátló antibakteriális
antibiotikumok

a.



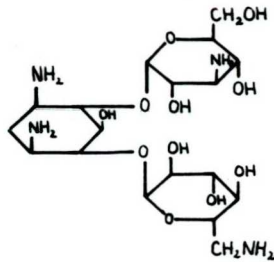
chloramphenicol /CP/

b.



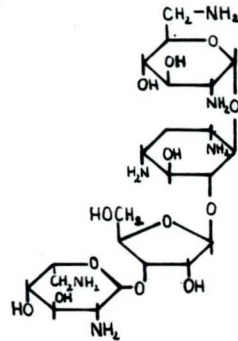
erythromycin /EM/

c.



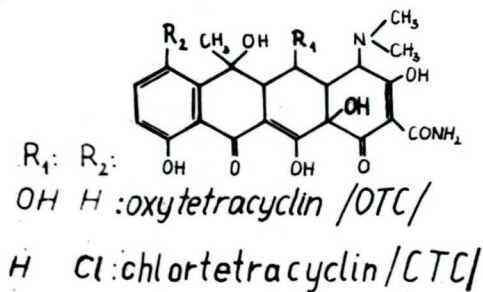
kanamycin /KM/

d.

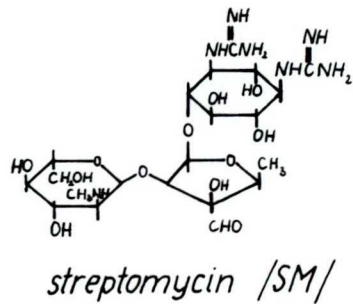


neomycin /NM/

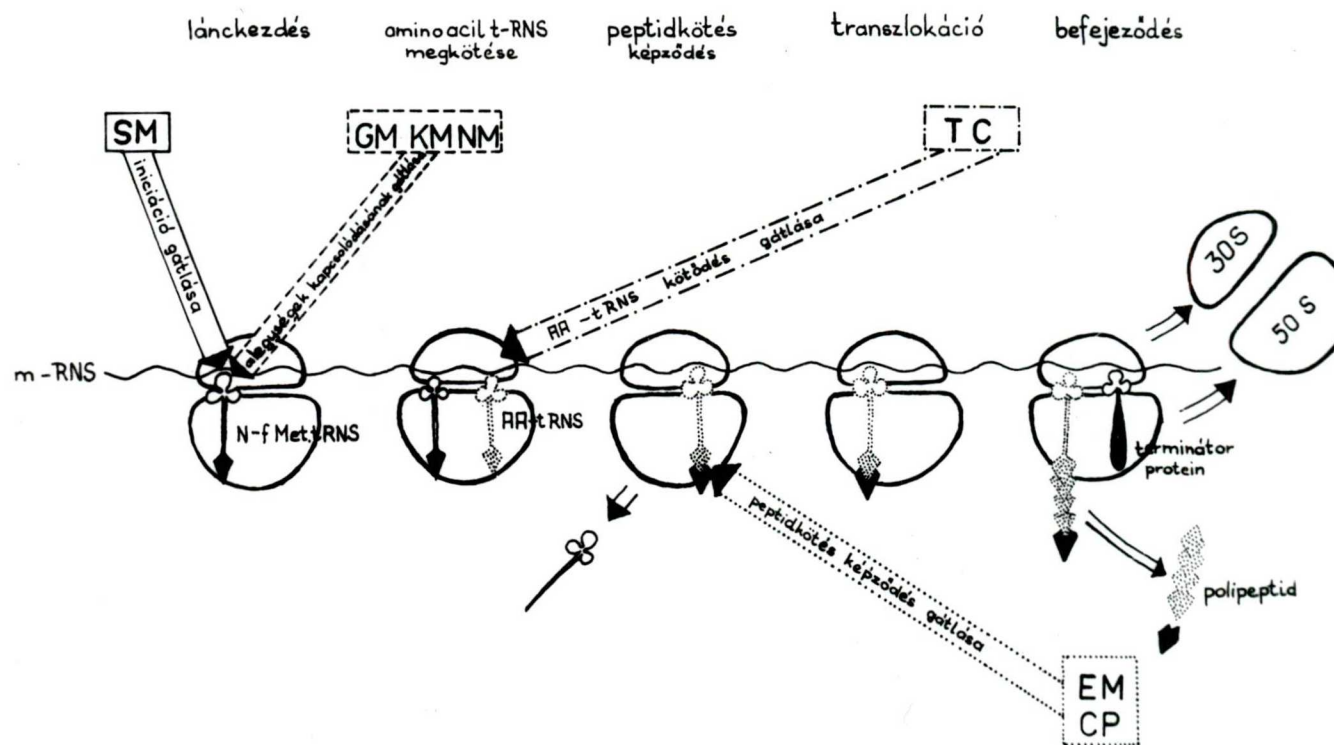
e.



f.



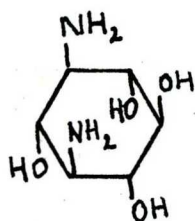
Fehérjeszintézisgátló antibakteriális antibiotikumok támadáspontjai



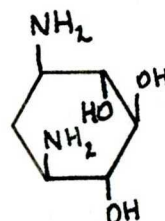
2. ábra

Aminoglükozid antibiotikumok

Az aminoglükozid antibiotikumok kémiai rokon vegyületek, amelyek közül a streptomycin /SM/, kanamycin /KM/, neomycin /NM/ és gentamycin /GM/ fehérjeszintézisgátló hatását ismertetjük. Valamennyiben megtalálható a streptamin vagy a 2-dezoxystreptamin, bár a GM pontos kémiai szerkezete még nem teljesen ismert.



streptamin



2-dezoxystreptamin

A hatásmechanizmus tanulmányozása azt mutatja, hogy ez a vegyületcsoport nemcsak szerkezeti, hanem funkcionális egységet is képez. A megvizsgált aminoglükozidok közül valamennyi a 30 S riboszóma alegység szintjén fejt ki gátló hatást, ami a riboszomális alegységek összekapcsolódásának gátlásában nyilvánul meg.

A SM az iniciáció gátlása során megakadályozza a fMet-tRNA^S-nek a 30 S alegységhez való kötődését.

A genetikai és biokémiai vizsgálatok során kimutattak egy proteint a 30 S alegységben /P₁₀/, amely SM és valószínűleg a NM és KM kötődésért is felelős.

Tetracyclinek

A tetracyclinek az antibiotikumok egy szerkezetileg sajátos csoportját alkotják. Az alapváz egy részben redukált antracén, amelyhez különböző szubsztituensek kapcsolódnak.

A tetracyclinek nagyon hatékony fehérjeszintézisgátló antibiotikumok, amelyek a bakteriális fehérjeszintézis riboszómális folyamatainak több lépését gátolják. A hatásmód azonban sokszor nem egyértelmű és függ az alkalmazott koncentrációtól is.

Elsődleges hatásuk az, hogy gátolják az aminosav-tRNS-nek az EF T-től függő 30 S riboszóma alegységen való enzimatis megkötődését a fehérjeszintézis elongációs szakaszában.

A tetracyclinek a fehérjeszintézis terminációs szakaszában is gátló hatást fejtenek ki, valószínűleg megakadályozzák a "release" faktorok felismerését.

A klórozott tetracyclin származékok /chlortetracyclin, demethyl-chlortetracyclin/ antibakteriális hatékonysága nagyobb és hatásspektrumuk szélesebb, mint az oxytetracycliné.

3. Az etidiumbromid hatása az élesztőgombák mitokondriális rendszerére

Az etidiumbromid /EB, 2,7-diamino-9-fenil-10-etil-fenantridinium bromid/ /4/a ábra/ kémiaailag rokon az aktindinfestékekkel, melyek RD-mutáns indukáló hatására már utaltunk. Mint tripanoszóma-ellenes drogról ismert volt, hogy gátolja a különböző organizmusok nukleinsav-szintézisét /Newton és mtsi 1963, Tomchick és Mandel 1964/ metakromatikus komplexet képezve a DNS-sel és az RNS-sel /Elliott 1963, Waring 1965/. Kimutatták, hogy Escherichia colinál gátló hatást fejt ki az RNS polimerázra /Richardson 1973/.

Az élesztőknél RD-mutációt indukál, amely extra-kromoszomális öröklődést mutat /Ephrussi 1953, Slonimski 1953/. Hatására a mt-DNS feldarabolódik, bázisösszetétele és mennyisége megváltozik, illetve teljesen eliminálódik, az EB

koncentrációjától és hatásidejétől függően /Slonimeki és mtsi 1968, Goldring és mtsi 1970, Nagley és mtsi 1973/.

Hatásmechanizmusáról ismert, hogy mint interkaláló ágens, beépül a DNS két szála közé, szétfeszíti, ezáltal megakadályozza annak ~~molekula~~ replikálódását /Waring 1965, 1970, Paoletti és Lepecq 1971, Denhardt és Kato 1973/. A molekula egyszerű interkalációja azonban nem ad magyarázatot más lényeges hatásaira, valamint a DNS teljes degradációjára. Jelzett EB-dal kimutatták, hogy kovalens kötés alakul ki a mt-DNS és az EB között /Mahler és Bastos 1974/. Az etidiumbromid stimuláló hatást fejt ki a mitokondriális DNAase-ra is /Paelotti és mtsi 1972/.

4. A cytoplazmatikus petite mutánsok mitokondriális DNS-ének jellemzői.

A cytoplazmatikus petite mutánsoknál a respirációs képesség elvesztését a mt-DNS szerkezetében bekövetkezett kisebb-nagyobb változások okozzák, ami lehet a mt-DNS teljes elvesztése / $\varnothing$ mutánsok/, ill. a mt-DNS deléciója, feldarabolódással, denzitásának és bázisösszetételének megváltozása / $\varnothing^-$ mutánsok/ Nagley és Linnane 1970, Mounolou és mtsi 1966, Bernardi és mtsi 1968/.

A $\varnothing^-$ sejtekben a mt-DNS mennyisége a legtöbb esetben azonos a grande sejtekével, bázisösszetétele azonban eltér. A G+C tartalom különböző mértékben csökkenhet, amivel párhuzamosan az A+T tartalom nő. Extrém esetben ún. "alacsony fajsúlyú /low, density/" petite-ek jönnek létre 3-4 % G+C tartalmú mt-DNS-sel míg a grande sejtek mt-DNS-ében a G+C tartalom 18% /Mounolou és mtsi 1966, Bernardi és mtsi 1972/.

A n y a g o k é s m ó d s z e r e k

1/Törzsek

Saccharomyces cerevisiae X 1687-16 C /Ade⁻, Arg⁻, His⁻,
Leu⁻, Lys⁻, Met⁻, Try⁻/ /Kaliforniai Egyetem, Berkeley/

Saccharomyces cerevisiae S 288 C /Kaliforniai Egyetem,
Berkeley/

Saccharomyces cerevisiae R XII. /Szegedi József Attila
Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszék Gyűjteményéből-
továbbiakban SzMC - 0054/

Saccharomyces diastaticus /SzMC 0643/

Saccharomyces logos /SzMC 0642/

Saccharomyces uvarum /SzMC 0641/

Saccharomyces rouxii /SzMC 0139/

Saccharomycodes ludwigii /SzMC 0720/

Schizosaccharomyces pombe /SzMC 0142/

Candida albicans CBS /SzMC 0056/

Dekkeroomyces fragilis /SzMC 0737/

Hansenula anomala /SzMC 0052/

Rhodotorula mucilaginosa /SzMC 0831/

2/ Táptalajok

Élesztőkivonatos táptalaj:

5 g élesztőkivonat /oxoid/, 10 g glükóz, deszt.vizzel
1000 ml-re kiegészítve. Szilárd táptalaj alkalmazása-
kor 30 g agart adunk az oldathoz. /pH 6-6,5/

Minimál táptalaj:

5 g /NH₄/₂SO₄, 1 g KH₂PO₄, 1 ml van der Walt és Kerken-
féle szintetikus vitamin oldat, deszt.vizzel 1000 ml-re
kiegészítve. Szénforrás a később ismertetésre kerülő

kísérletek szerint. Szilárd táptalaj alkalmazása esetén 30 g agart adunk az oldathoz. /pH 6,5/.

3/ Antibiotikumok

Chloramphenicol /CP/

Egyesült Gyógyszer- és Tápszergyár, Budapest

Chlortetracyclin /CTC/

CHINOIN, Budapest

Erythromycin /EM/ Glucoheptonate

Marsing By Co., Ltd., Copenhagen, Denmark

Erythromycin /EM/ Lactobionate

Abott Laboratories Ltd., Quenborough, Kent

Etidiumbromid /EB/

Sigma Chemical Company St. Louis, USA

Gentamycin /GM/

Péterffy Sándor utcai Kórház Farmakokinetikai
laboratóriuma, Budapest

Kanamycin /KM/

Continental Pharma, Belgium

Neomycin /NM/

Soc. In. Fabric antibio., Paris

Oxytetracyclin-hidrochlorid /OTC/

CHINOIN, Budapest

Streptomycin /SM/ sulfate

CHINOIN Budapest

Az antibiotikumokat a táptalajba való bevitel előtt annyi etanolban vagy dimetil-szulfoxidban /DMSO/ oldottuk 24 órán keresztül, hogy a táptalajban az oldószer mennyisége max. 1% legyen.

4/ Inkubáció

Az inkubáció valamennyi kísérletnél 30°C-on történt.

5/ Antibiotikus kezelés

Az antibiotikumokkal történő kezelést két módszer szerint végeztük, egyik esetben a tenyésztés tápoldatban, míg a másik esetben a táptalaj felületén történt.

a/ folyadékos módszer

24 órás tenyészetből szuszpenziót készítünk, és 20 ml 8 mm rétegvastagságú, a megfelelő antibiotikumot tartalmazó élesztőkivonatos tápoldatot kb. 10^4 sejttel beoltjuk. Az inkubációt hat napig álló tenyésztéssel aerob körülmények között végezzük és a harmadik illetve a hatodik napon a tenyészetből mintát véve meghatározzuk a petite és grande sejtek arányát.

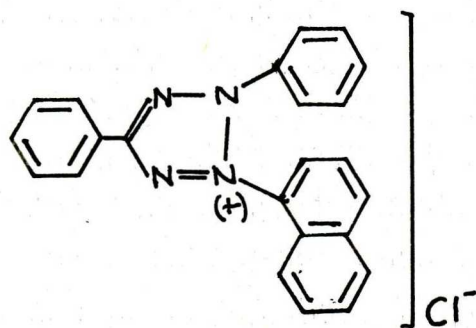
b/ felületen történő tenyésztés

A megfelelő antibiotikumot tartalmazó élesztőkivonatos táptalajból lemezt öntünk, és ennek felületére viszük fel a különböző törzsek 24 órás tenyészetéből készített, 10^5 sejtet tartalmazó szuszpenziót folt alakjában. 48, az EB esetében 24 órás inkubáció után a tenyészetekből kb. 10^5 sejtet új felületre viszünk át, és ezt a kezelés során még néhányszor megismételjük. A petite és grande sejtek arányát az átoltások során meghatározzuk. A két módszert összehasonlítva előnyösebbnek mutatkozik a második. E módszer alkalmazása mellett szól az, hogy a kezelés során a tenyészet a továbboltások révén mindig jó tápanyagellátottságú és azonos antibiotikumtartalmú körülmények közé kerül, valamint ez az eljárás lényegesen kevesebb antibiotikumot igényel.

6/ Az RD-mutáció kimutatására alkalmazott módszerek

a/ A redukálóképesség vizsgálata tetrazolium vegyületekkel

A normális légzésű élesztők a tetrazolium vegyületeket színes formazánokká redukálják. Ez a redukció a mitokondriális enzimrendszer segítségével történik, és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kimutatták, hogy a formazán a mitokondrium-kriszták membránjában 60-100 Å nagyságú granulumok formájában halmozódik fel. A redukcióban a mitokondriális dehidrogenázok, főként a szukcinát dehidrogenáz vesznek részt /Castelletto de Fanchiotti és mtsi 1971/. Az RD-mutánsokban a légzési enzimek hiánya következtében a redukálóképesség erősen csökkent vagy hiányzik, így ezek a tetrazolium vegyületekkel nem, vagy csak nagyon kevésbé festődnek /Rant 1954, Bachafen és mtsi 1972/. Kísérleteink során több tetrazolium-vegyületet megvizsgáltunk, hogy kiválasszuk azt, amellyel a normális légzésű élesztők intenzíven színeződnek, az RD-mutánsok azonban nem festődnek. Kísérleteinkben a tetrazolium-violetet /2,5 difenil-3naftil-tetrazolium-klorid, továbbiakban TV/ alkalmaztunk, amely a normális légzésű élesztőket intenzív ibolya színűre festi.



tetrazolium violet

A TV-t annyi DMSO-ban oldva vittük a táptalajba, hogy a DMSO koncentrációja 1% legyen.

A TV-s festésnek több változatát alkalmaztuk:

— A TV nélküli lemezen kinőtt telepeket 1 mg/ml

TV-t tartalmazó 1,5 %-os felolvasztott agarral lefedjük. Ez a módszer megegyezik az un. Ogur-féle technikával /Ogur 1957/, kivéve, hogy itt a 2, 3, 5-trifeniltetrazóliumklorid /TTC/ helyett TV-t alkalmaztunk. A festődés a törzsektől függően 1-24 óra múlva látható, amit azonban a telepek kora is erősen befolyásol. Az idősebb telepek általában lassabban, egyáltalán nem, vagy csak a szélükön festődnek, ami vizsgálatainknál félreértésre adhat alkalmat.

— Ezeket a hibákat kiküszöbölhetjük, ha a TV-s festést a következő módszer szerint végezzük: a glükózt tartalmazó táplemezen kinőtt telepeket 30-40 órás inkubáció után 25 μ g/ml TV-t és glükózt tartalmazó lemezekre replikázzuk /képmelléklet l. kép/. Ily módon ugyanis sokkal nagyobb telepeket kapunk, mint az előző esetben, valamint a petite és grand telepek rövidebb inkubációs idő /kb. 30 óra/ után még biztosabban elkülöníthetők. Kísérleteink szerint a TV ebben a koncentrációban RD-mutációt nem indukál.

— A TV jól jelzi az antibiotikumok légzésgátló hatását is. Ezért a felületen történő antibiotikus kezelés során a táptalajba 25 μ g/ml TV-t is vittünk be, hogy a redukáló képesség változását a tenyészetek színeződése alapján figyelemmel kísérjük.

b/ Cukorasszimiláció vizsgálata

Az élesztők diagnosztizálására alkalmazott cukrok közül azokat, amelyeket a grande törzs nem képes erjesztetni, az RD-mutánsok nem képesek felhasználni. Abban a minimál

táptalajban, amely szénforrásként pl. csak galaktózt illetve maltózt tartalmaz, az RD-mutások nem szaporodnak /Markovich 1951, Lindegren és mtsi 1957/. A cukorasszimilációs vizsgálat egyrészt a Beijerinck-féle auxonográfiával /Beijerinck 1889/, másrészt turbidimetriás növekedsméréssel történt.

c/ Kismolekulájú szénforrások hasznosítása

Abban a táptalajban, amely csak olyan kismolekulájú szénforrást tartalmaz, amelyet az élesztők kizárólag oxidatív lebontás útján tudnak hasznosítani, az RD-mutások nem növekednek. Ilyen vegyületek a glicerín, acetát, laktát és az etanol /Nagai és mtsi 1961, Michael és mtsi 1971, Williamson és mtsi 1971/.

Az RD-mutás diagnózis úgy történt, hogy a glükóz tartalmú lemezekre kioltott törzseket a megfelelő szénforrást tartalmazó lemezekre replikáztuk /képmelléklet 2. 3. kép/.

d/ citokrom-spektrum vizsgálata

A különböző törzsek petite és grande telepeit tápoldatban rázatva elszaporítottuk, majd a sejteket kimostuk, és nátrium-ditionit 5%-os vizes oldatával redukáltuk. A citokromspektrumot kézispektroszkóppal /VEB Carl Zeiss, Jena/ vizsgáltuk.

7/ Az Élesztők sejtmag és mitokondriális DNS-ének elválasztása festék/CsCl fajsúlygrádiens centrifugálással.

Az élesztők mag- és mt-DNS-ének fajsúlya eltér, ami lehetővé teszi, hogy CsCl fajsúlygrádiensben a kétféle DNS-t szeparáljuk. *Saccharomyces cerevisiae*-nél a mag- és mt-DNS fajsúlya közti különbség $0,015 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$, amely

alapján CsCl gradiensben már két sávot alkotnak /Bernardi és mtsi 1970/.

Annak eldöntésére, hogy az antibiotikumokkal indukált petite mutánsokban a mt-DNS denzitásában milyen változás történt, a sejtek mag- és mt-DNS-ét festék /CsCl fajsúlygradiensben szeparáltuk /3. ábra/. A sejteket folyékony élesztőkivonatos táptalajban tenyésztettük 10-12 órán keresztül, majd kb. 2×10^9 sejtet 0,6 M KCl-dal átmostunk és a sejtekből csigaenzimes kezeléssel protoplasztokat képeztünk. A protoplasztáló közeg összetétele az alábbi volt: 0,6 M KCl

1,5 % liofilizált csigaenzim

1,0 % merkaptoetanol

Kb. 2 órás szobahőmérsékleten történő inkubáció alatt a sejtek 98-100 %-ban protoplasztálódtak. A protoplasztokat 0,6 M KCl-dal kimostuk / 2×5 perc, $3.000 \times g$ /. A mag- és mt-DNS kivonása és elválasztása a Williamson és Fennell által kidolgozott módszer szerint történt /Williamson és Fennell 1974/. A protoplasztok és mitokondriumok lizise sarcosyllal /Na-lauryl-sarcosinát/ történt 60°C -on 15 percig, magas pH-n, hogy a nukleázaktivitást gátoljuk. A lizáló oldat összetétele: 0,2 M Tris-HCl puffer /pH 8/

0,1 M EDTA- Na_2

2 % Sarcosyl NL97 /Geigy, UK/

2×10^9 protoplaszthoz 4 ml oldatot adunk, 15 perc lizis után gyors hűtés következik, majd a sejttörmelék és az ép sejtek eltávolítása centrifugálással történik /15 perc, 0°C , 12.000 ford./ perc; Janetzki VAC 601, SW 3x5 ml rotor/. A felülúszóból 3,9 ml-t adunk 4,00 g CsCl-hoz /BDH England/. A CsCl feloldódása után 0,1 ml-t mérünk be a DNS-hez kötődő fluoreszkáló festékek törzs-

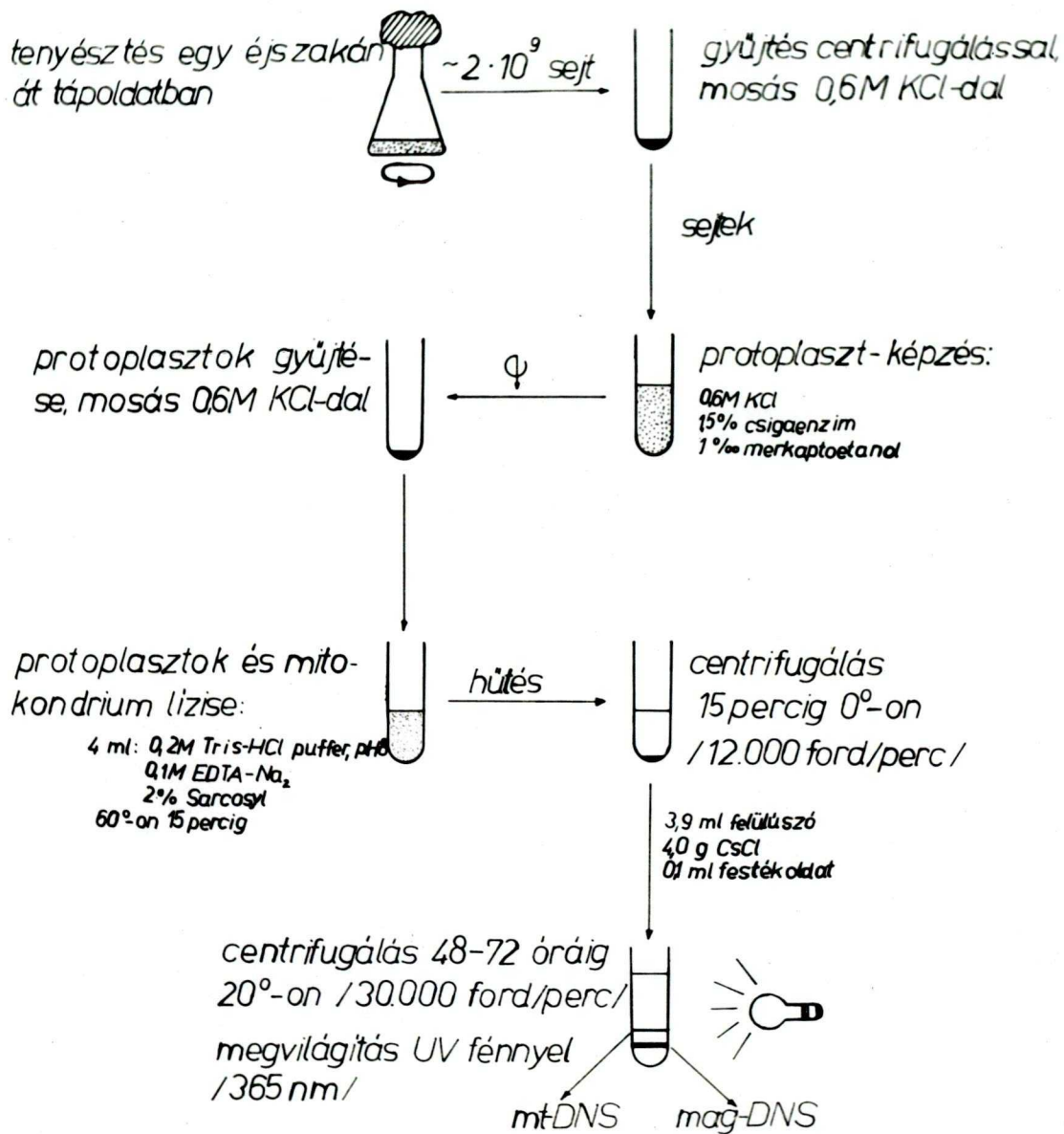


oldataiból /oldás deszt.vizben/. A DNS kimutatásához
3 féle fluoreszkáló festéket próbáltunk ki: /4. ábra/1/
etidiumbromid

2/ DAPI

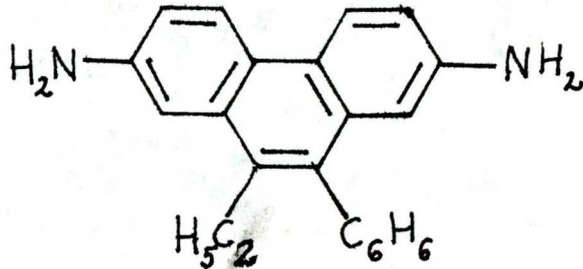
3/ Hoechst 33 258 sz. vegyület

A törzsoldat koncentrációja az etidiumbromid esetében 23 mg/ml
a másik két festéknél 10 mg/ml volt. A CsCl fajsúlygra-
diens kialakításához a mintákat 20°C-on 48-72 óráig
centrifugáltuk 30.000 percenkénti fordulatszámmal, mielőtt
a kétféle DNS fajsúlyuknak megfelelően a gradiensben
egy-egy sávban gyűlik össze. A centrifugacsöveket UV
fényrel /365 nm/ megvilágítva a mag- és mt-DNS sávja
a hozzájuk kötődő festék miatt fluoreszkálni fog. A
grande és petite sejtek mt-DNS sávjának helyzetét össze-
hasonlítva a denzitásbeli változásokat kiértékelhetjük.



3. ábra: Élesztők sejtmag és mitokondriális DNS-ének szeparálása fluoreszcens festék/CsCl fajsúlygrádiens centrifugálással.

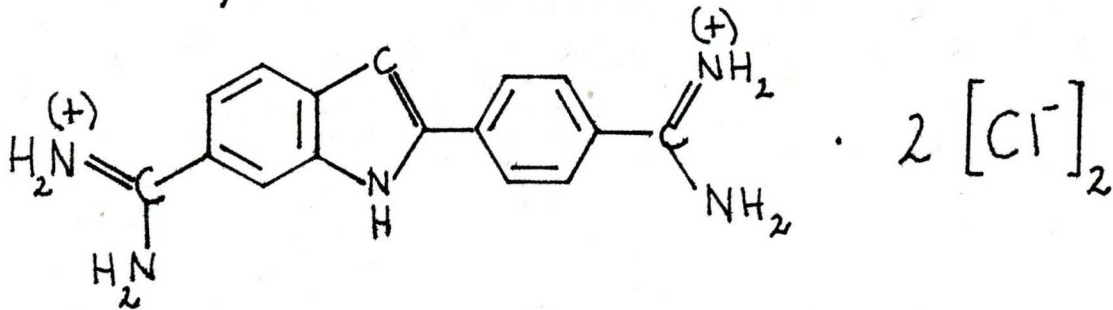
1/



etidiumbromid /EB/

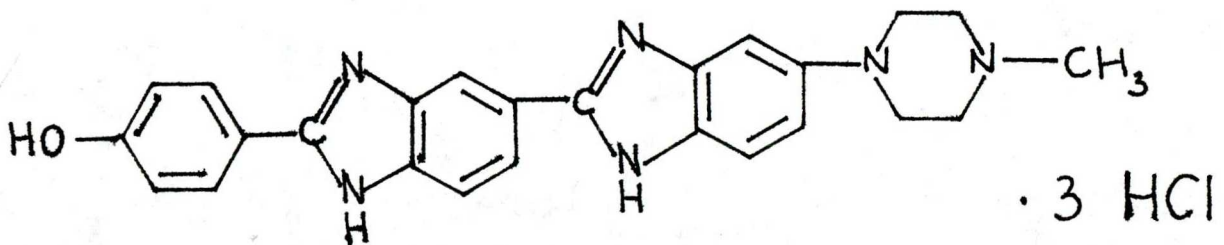
2,7-diamino-9-fenil-10-etil-fenantridiniumbromid

2/



4,6-diamidino-fenilindol /DAPI/

3/



Hoechst 33 258 sz. vegyület

2-[2-/4-hidroxifenil/-6-benzimidazolil]-6-/1-metil-4-piper-
azil/-benzimidazol-trihidroklorid

4. ábra: DNS-hez kötődő fluoreszkáló festékek

E r e d m é n y e k i s m e r t e t é s e

1/ A chloramphenicol, erythromycin, streptomycin és oxytetracyclin RD-mutáns induktor aktivitása a Saccharomyces cerevisiae két törzsében, folyadékos tenyészetben.

A CP, SM, EM és OTC nagyon hatékony antibakteriális antibiotikumok, ezért megvizsgáltuk RD-mutáns indukáló aktivitásukat a Sacch. cer. egy prototróf /S288c/ és egy auxotróf /X1687-16C/ törzsénél. A folyékony közegben folytatott antibiotikumos kezelés során a CP-t 3 mg/ml, az EM-t 1,5 mg/ml, a SM-t és az OTC-t 2 mg/ml koncentrációban alkalmaztuk. Az antibiotikumok ugyanis ilyen koncentrációnál még nem okoznak teljes növekedésgátlást és a táptalajban oldva maradnak. A hatnapos kezelés során a tenyészetekben a harmadik és hatodik napon meghatároztuk a petite és grande sejtek arányát TV-vel való színeződés alapján. A kísérletek szerint a SM és a CP teljesen hatástalannak mutatkozik, egy törzsénél sem indukál petite mutációt. Az EM és OTC azonban jelentős RD-mutáns indukáló aktivitást mutatott a hatnapos kezelési periódus alatt. Az eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

Törzs	Petite arány az összsejtszám %-ában			
	OTC 2 mg/ml		EM 1,5 mg/ml	
	3. nap	6. nap	3. nap	6. nap
Sacch. cer. S288c	36	34	77	63
Sacch.cer. X1687-16C	99	85	99	93

1. táblázat: Az OTC és EM RD-mutáns indukáló aktivitása a *Saccharomyces cerevisiae* S288c és X1687-16C törzsekben. Diagnózis TV-vel való színeződés alapján.

Az S288c törzs a háromnapos OTC-s kezelés után 36% RD-mutánst produkál, míg az EM ennél jóval hatékonyabb, 77% RD-mutáns gyakoriságot indukál. Ugyanakkor az X1687-16C törzsnél mindkét antibiotikum optimális hatású, alkalmazásával csaknem 100%-os RD-mutáns indukció érhető el. Meg kell azonban említeni, hogy ennél a törzsnél szokatlanul magas a spontán petite mutáció gyakorisága, 70% körüli érték. A kísérlet során mindkét törzsnél, mindkét antibiotikum alkalmazásakor csökken az RD-mutánsok aránya a 6 napos kezelés végére, ami valószínűleg az antibiotikum rezisztens sejtek nagyobb szaporodási képességének tulajdonítható.

Szükségesnek láttuk, hogy meggyőződjünk arról, hogy az antibiotikumos kezelés valóban petite mutációt indukál és nemcsak a redukciós kapacitás csökkenését eredményezi. Ezt a mutáns telepek citokróm spektrumának vizsgálata döntötte el. Az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

Törzs	Antibiotikum	Telepek /TV-s festő- dés alapján/	Citokróm		
			a	b	c
Sacch. cer. S288c	--	grande	++	+++	+++
	--	petite	-	-	-
	OTC 2 mg/ml	petite	-	-	-
	EM 1,5 mg/ml	petite	-	-	//+//
Sacch. cer. X1687-16C	--	grande	+++	+++	+++
	--	petite	-	-	/+//
	OTC 2 mg/ml	petite	-	-	/+//
	EM 1,5 mg/ml	petite	-	-	-

2. táblázat: Az OTC és EM antibiotikumokkal kezelt *Saccharomyces cerevisiae* S288c és X1687-16C törzsek petite és grande telepeinek citokróm spektruma. Citokróмок abszorpciós maximuma:

citokróm a 603 nm

citokróm b 565 nm

citokróm c 550 nm

A + jelek száma a megfelelő citokróm abszorpciós sávjának intenzitásával arányos.

A - jel az abszorpciós sáv hiányát jelzi.

A kísérleti adatok alátámasztják az antibiotikumok mutáns-indukáló képességét, ugyanis a TV-vel nem festődő telepeknél a citokróm a és b minden esetben hiányzik, a citokróm c pedig vagy nagyon halványan vagy egyáltalán nem látszik.

2/ Antibakteriális antibiotikumok RD-mutáns induktor hatásának vizsgálata a felületen történő tenyésztés módszerével

A CP, EM, SM, NM, KM, GM valamint ÖTC és CTC antibiotikumok RD-mutáns induktor aktivitását vizsgáltuk öt *Saccharomyces* törzsnél /S. cer. S288c, RXII, S. diastaticus, logos és uvarum/ az antibiotikumok koncentrációjának és hatásidejének függvényében. Az alkalmazott maximális antibiotikum koncentrációt ennél a módszernél is az antibiotikumok oldékonysága és növekedésgátló hatása szabta meg. Amennyiben az alkalmazható legmagasabb koncentrációban az antibiotikum 100% körüli RD-mutációt indukált, a felelő higitások hatékonyságát is megvizsgáltuk.

a/ Az 50 S alegységre ható fehérjeszintézisgátló antibakteriális antibiotikumok RD-mutáns indukáló hatása.

Az 50 S riboszóma alegységen ható antibiotikumok közül a CP és EM hatását vizsgáltuk.

Chloramphenicol /CP/

A CP-t a kezelés során $5 \cdot 10^{-2}$ M koncentrációban alkalmaztuk.

A CP egyik törzsnél sem növelte az RD-mutánsok arányát annak ellenére, hogy a tenyészetek formazánképző hatását erősen lecsökkentette.

Erythromycin /EM/

Az EM 10^{-2} M koncentrációban a növekedést erősen gátolta, ezért az átoltást 48 óránként végeztük.

Az EM RD-mutáns indukáló hatása ebben a koncentrációban 100% közelében volt, ezért a hatékonyságot alacsonyabb

koncentrációknál is megvizsgáltuk. Az eredményeket a 3/a, b táblázat, 1. diagram tartalmazza.

10^{-2} M EM koncentrációnál az indukciós idő az egyes törzseknél különböző. A Sacch. cer. S288c, RXII, Sacch. diastaticus és uvarum törzsekben, ahol a petite mutáns indukció 100% közelében van, már négy-napos kezelés után 70-80% RD-mutáns produkció tapasztalható. A Sacch. logos esetében négy-napos kezelés alatt a mutánsgyakoriság csak 31%-ra nő, és a maximum 65%.

Az alacsonyabb EM koncentrációknál a petite gyakoriságot csak a 2., 6. illetve a 10. kezelési nap után határoztuk meg, mivel az előző kísérletek azt mutatták, hogy a maximális hatékonyságot ezek az adatok is tükrözik.

$5 \cdot 10^{-3}$ M EM koncentrációnál a petite mutánsok aránya minden törzsben csökken, de a csökkenés különböző mértékű. A legmagasabb RD-mutáns százalékot minden törzs hatnapos kezelés után éri el, ami a Sacch. diastaticus esetében 88%, a Sacch. cer. S288c, R XII és Sacch. logos esetében 30% körüli érték, a Sacch. uvarumnál pedig mindössze 7%. Extrém mértékben lecsökken a mutánsgyakoriság tíznapos kezelés után, ami az antibiotikum-rezisztens telepek sokkal nagyobb szaporodási képességének tulajdonítható.

A $2,5 \cdot 10^{-3}$ M EM koncentrációnál a Sacch. cer. S288c és R XII törzsek 15% körüli RD-mutációt produkálnak, míg a másik három törzs csak a spontán petite gyakoriság körüli petite arányt mutatja.

$1,25 \cdot 10^{-3}$ M koncentrációban az EM valamennyi vizsgált törzs esetében hatástalannak mutatkozik.

b/ A 30 S alegységre ható fehérjeszintézisgátló antibakteriális antibiotikumok RD-mutáns indukáló hatása

A 30 S riboszóma alegységre ható antibiotikumok közül a SM, GM, KM, NM és OTC RD-mutáns indukáló hatását vizsgáltuk.

Streptomycin /SM/

A SM 10^{-2} M koncentrációban egyik törzsnél sem mutat RD-mutáns indukáló hatást és a tenyészetek formazánképzését sem gátolja.

Gentamycin /GM/, kanamycin /KM/, és neomycin /NM/

Jóllehet a GM, KM és NM antibiotikumok bakteriális fehérjeszintézis gátlásában teljesen azonos módon hatnak, a GM és KM 10^{-2} M koncentrációban a vizsgált öt élesztőtörzs egyikében sem indukál RD-mutációt, míg a 10^{-2} M koncentrációjú NM RD-mutáns indukáló hatása mind az öt törzsnél jelentős.

/3. a, b táblázat, 2. diagram/ A petite mutánsok arányának maximuma különböző kezelési idő elteltével észlelhető: a Sacch. cer. S288c és R XII törzs nyolcnapos kezelés után, a Sacch. diastaticus, logos és uvarum pedig tíznapos kezelés után éri el az RD-mutáns produkció maximumát, ez azonban mindegyik törzsnél 50% alatt marad.

A GM-nél és KM-nél a formazánképzés gátlását nem tapasztaltuk, a NM jelenlétében azonban a tenyészetek TV-redukáló képessége csökkent.

Oxytetracyclin /OTC/

Az OTC 10^{-2} M koncentrációban kitűnő petite-mutáns induktornak bizonyult. /4/a, b táblázat, 3. diagram/ A petite mutáció gyakorisága valamennyi törzsnél 100% körüli érték. Az antibiotikum mutáns indukáló hatása már kétnapos kezelés alatt megmutatkozik, és négynapos kezelés után mind az öt törzsnél

50 % feletti a petite mutánsok gyakorisága.

A maximális RD-mutáns produkció eléréséhez a Sacch. cer. S288c és Sacch. uvarum esetében 6 nap, a Sacch. diastaticusnál és logosnál 8 nap, a Sacch. cer. RXII-nél pedig 10 nap szükséges.

Az antibiotikum jelenlétében a tenyészetek TV-vel nem festődnek.

Az alacsonyabb OTC koncentrációk hatékonyságának megállapítására ez esetben is a felező higitások mutánsindukáló aktivitását vizsgáltuk.

$5 \cdot 10^{-3}$ M OTC koncentráció alkalmazásakor a petite mutáns produkció valamennyi törzsenél 50% alatt volt, és a maximális gyakoriságot 6 napos kezelés után mutatták.

10 napos kezelés elteltével valamennyi törzs csak a spontán mutációs gyakoriság körüli értéket produkálta, ami ez esetben is az antibiotikum-rezisztens telepek nagyobb szaporodási képességének tulajdonítható.

Az $2.5 \cdot 10^{-3}$ M és $1.25 \cdot 10^{-3}$ M koncentrációban már nem bizonyult hatásosnak.

Az OTC koncentrációjának csökkenésével a tenyészetek TV-vel való festődése fokozatosan erősödött.

Chlortetracyclin /CTC/

A 7. C-atomon klórozott tetracyclin származék, a CTC nemcsak nagyobb antibakteriális hatású, hanem jobb petite induktor is, mint az OTC /4/a, b táblázat, 4. diagram/.

10^{-2} M koncentrációban a Sacch. diastaticus, logos és uvarum törzsekben már a második napra, a Sacch. cer. RXII-ben pedig a negyedik napra 100%-os RD mutáns gyakoriságot eredményezett és ez az érték további kezelés során nem változott. A Sacch. cer. S288c esetében 99% volt a maximális RD-mutáns gyakoriság.

antibio- tikum koncent- ráció /M/	petite arány az összsejtszám %-ában																								
	Sacch.cer.S288c					Sacch.cer R XII.					Sacch.diastaticus					Sacch.logos				Sacch.uvarum					
	nap					nap					nap					nap				nap					
	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10
EM 10 ⁻²	12	80	83	90	98	2	68	89	98	100	3	73	83	100	100	4	31	60	64	65	1	93	98	97	98
EM 5.10 ⁻³	4		35		8	1		25		2	12		88		2	3		25		4	1		7		1
EM 2,5.10 ⁻³	2		16		2	2		14		12	1		2		2	2		4		4	1		1		1
EM 1,25.10 ⁻³	4		2		5	4		2		2	2		2		1	4		4		3	1		1		1
NM 10 ⁻²	6	11	41	42	30	10	20	23	26	21	3	3	28	30	39	10	14	16	28	30	10	14	10	16	27

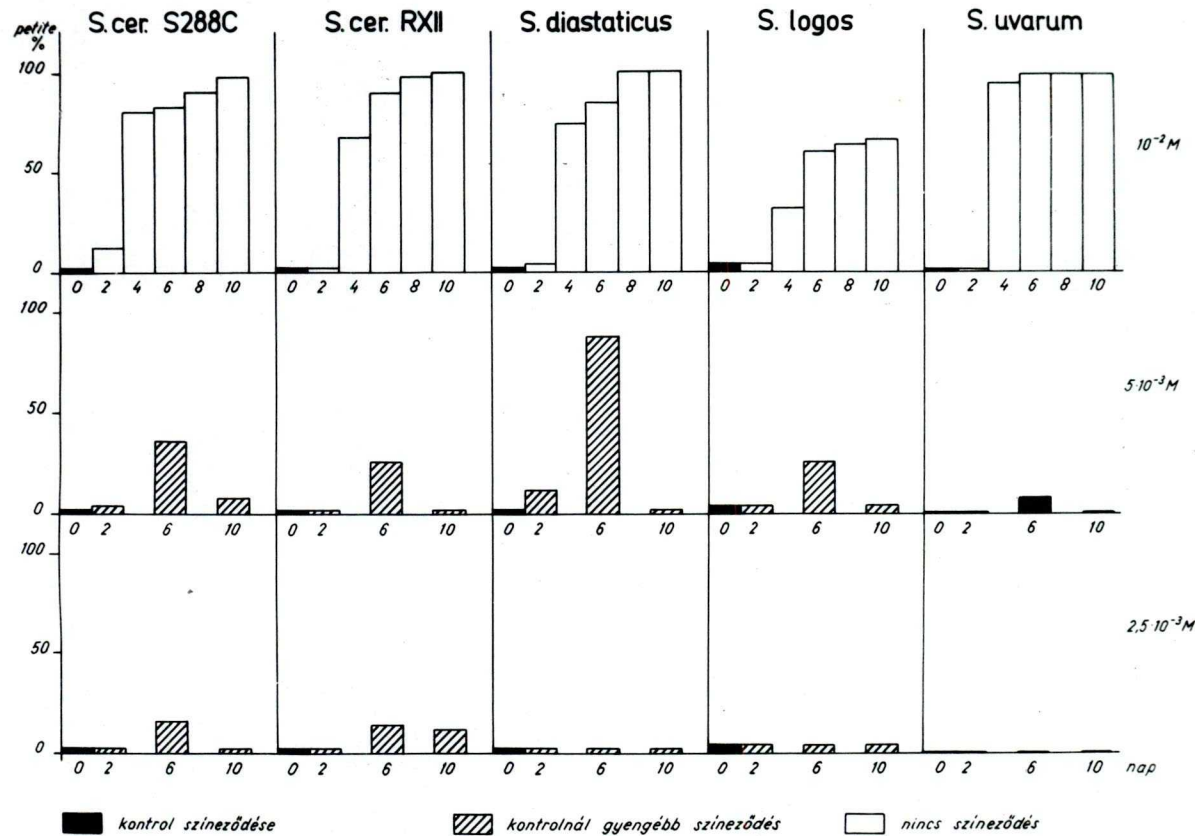
3/a táblázat: az EM és NM RD-mutáns indukáló hatékonysága a koncentráció és a hatásidő függvényében a *Saccharomyces cerevisiae* S288c, a *Saccharomyces cerevisiae* R XII., a *Saccharomyces diastaticus*, a *Saccharomyces logos* és *uvarum* törzsekben. Diagnózis a TV-vel való festődés alapján.

antibio- tikum koncent- ráció/M/	Sacch.cer. S288c				Sacch.cer. R XII.				Sacch.diastaticus				Sacch. logos				Sacch.uvarum			
	nap				nap				nap				nap				nap			
	0	2	6	10	0	2	6	10	0	2	6	10	0	2	6	10	0	2	6	10
EM 10^{-2}	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
EM $5 \cdot 10^{-3}$	+++	++	+	+	+++	+	+	++	+++	+	-	+	+++	+	+	+	+++	++	+++	+++
EM $2,5 \cdot 10^{-3}$	+++	+	+	++	+++	+	++	++	+++	+	++	++	+++	+	++	++	+++	+	+++	+++
EM $1,25 \cdot 10^{-3}$	+++	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
NM 10^{-2}	+++	++	+	+	+++	++	+	+	+++	+	+	+	+++	++	+	+	+++	+	+	+

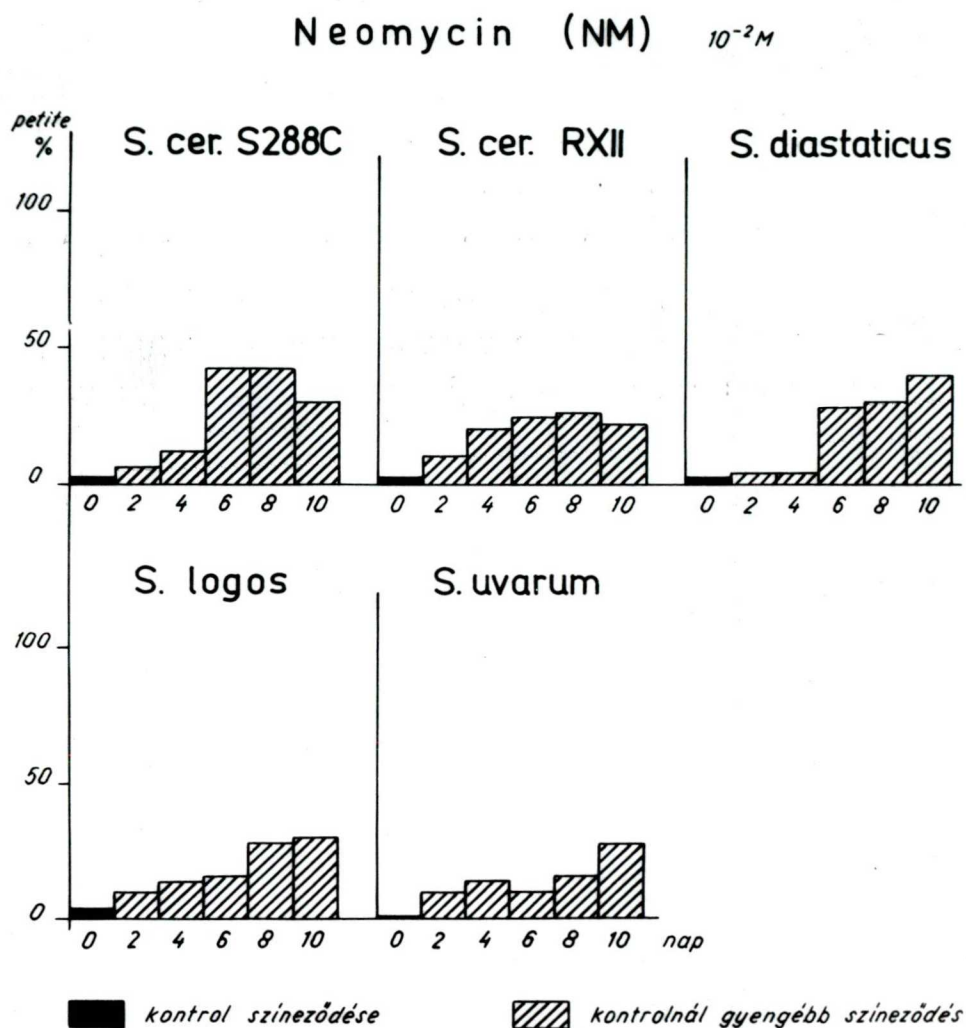
3/b táblázat: Az EM és NM formazánképzés-gátló hatása a koncentráció és a hatásidő függvényében a *Saccharomyces cerevisiae* S288c, *Saccharomyces cerevisiae* R XII., *Saccharomyces diastaticus*, *logos* és *uvarum* törzsekben. A diagnózis alapja a tenyészetek TV-vel való színeződése az antibiotikumos kezelés alatt.

- jel a TV-redukáló képesség teljes hiányát jelenti /nincs festődés/
- + jelek száma a tenyészetek festődésével arányos.

Erythromycin (EM)



1. diagram: Az EM RD-mutáns indukáló hatékonysága különböző antibiotikum koncentrációknál a hatásidő függvényében a *Saccharomyces cerevisiae* S288c, RXII, *Sacch. diastaticus*, *logos* és *uvarum* törzsekben.



2. diagram: A NM RD-mutáns indukáló hatékonysága a hatásidő függvényében a *Saccharomyces cerevisiae* S288c, RXII, *Sacch. diastaticus*, *logos* és *uvarum* törzsekben.

Antibio- tikum koncent- ráció /M/	Petite arány az összsejtszám %-ában																								
	Sacch.cer. S288c					Sacch.cer. R XII.					Sacch.diastaticus					Sacch. logos					Sacch. uvarum				
	nap					nap					nap					nap					nap				
	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10
OTC _{10⁻²}	13	66	95	89	80	8	56	85	85	91	48	75	98	100	100	35	75	90	100	100	27	70	100	100	10
OTC _{5.10⁻³}	5		19		2	8		42		2	6		29		2	11		9		4	2		7		1
OTC _{2,5.10⁻³}	2		2		2	6		7		2	1		8		2	6		7		4	1		1		1
OTC _{1,25.10⁻³}	3		3		2	2		2		1	2		2		2	3		4		4	1		1		1
CTC _{10⁻²}	70	94	98			98	100	100			100	100	100			100	100	100			100	100	100		
CTC _{5.10⁻³}	55	59	43			28	70	76			58	60	100			35	91		100		91	100	100		
CTC _{2,5.10⁻³}	17	25	17			8	36	26			7	32	36			4	13		2		3	23	14		

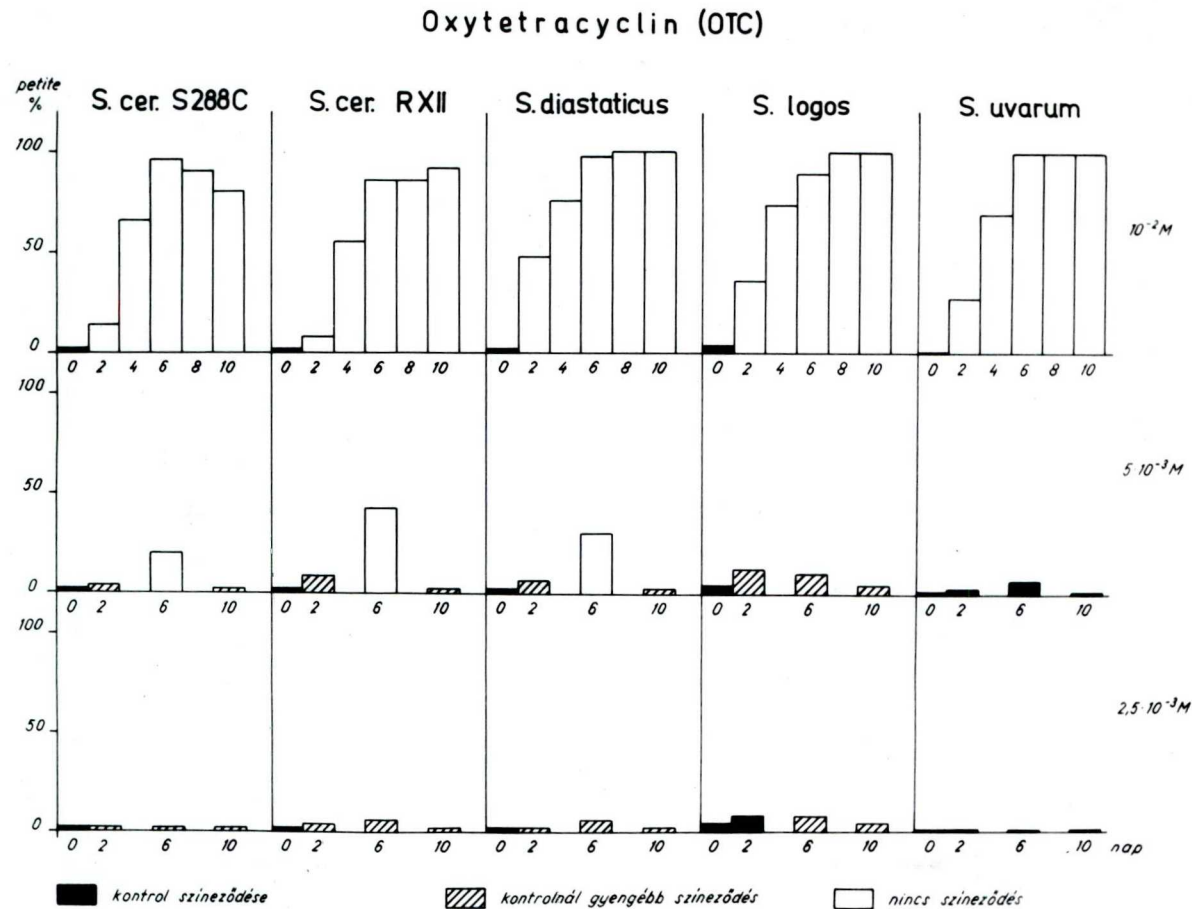
4/a táblázat: az OTC és CTC RD-mutáns indukáló hatékonysága a koncentráció és a latenciáidő függvényében a *Saccharomyces cerevisiae* S288c, a *Saccharomyces cerevisiae* R XII., a *Saccharomyces diastaticus*, logos és uvarum törzsekben. Diagnózis a TV-vel való festődés alapján.

antibio- tikum koncent- ráció/M/	Sacch.cer. S288c				Sacch.cer. R XII.				Sacch.diastaticus				Sacch.logos				Sacch.uvarum			
	nap				nap				nap				nap				nap			
	0	2	6	10	0	2	6	10	0	2	6	10	0	2	6	10	0	2	6	10
OTC 10^{-2}	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
OTC $5 \cdot 10^{-3}$	+++	+	-	+	+++	+	-	+	+++	+	-	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
OTC $2,5 \cdot 10^{-3}$	+++	++	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
OTC $1,25 \cdot 10^{-3}$	+++	++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CTC 10^{-2}	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
CTC $5 \cdot 10^{-3}$	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-
CTC $2,5 \cdot 10^{-3}$	+++	+	++	++	+++	+	-	+	+++	+	+	+	+++	++	+	++	+++	++	+	++

4/b táblázat: Az OTC és CTC formazánképzés gátló hatása a koncentráció és a hatásidő függvényében a *Saccharomyces cerevisiae* S288c, *Saccharomyces cerevisiae* R XII., *Saccharomyces diastaticus*, *logos* és *uvarum* törzsekben. A diagnózis alapja a tenyészetek TV-vel való színeződése az antibiotikus kezelés alatt.

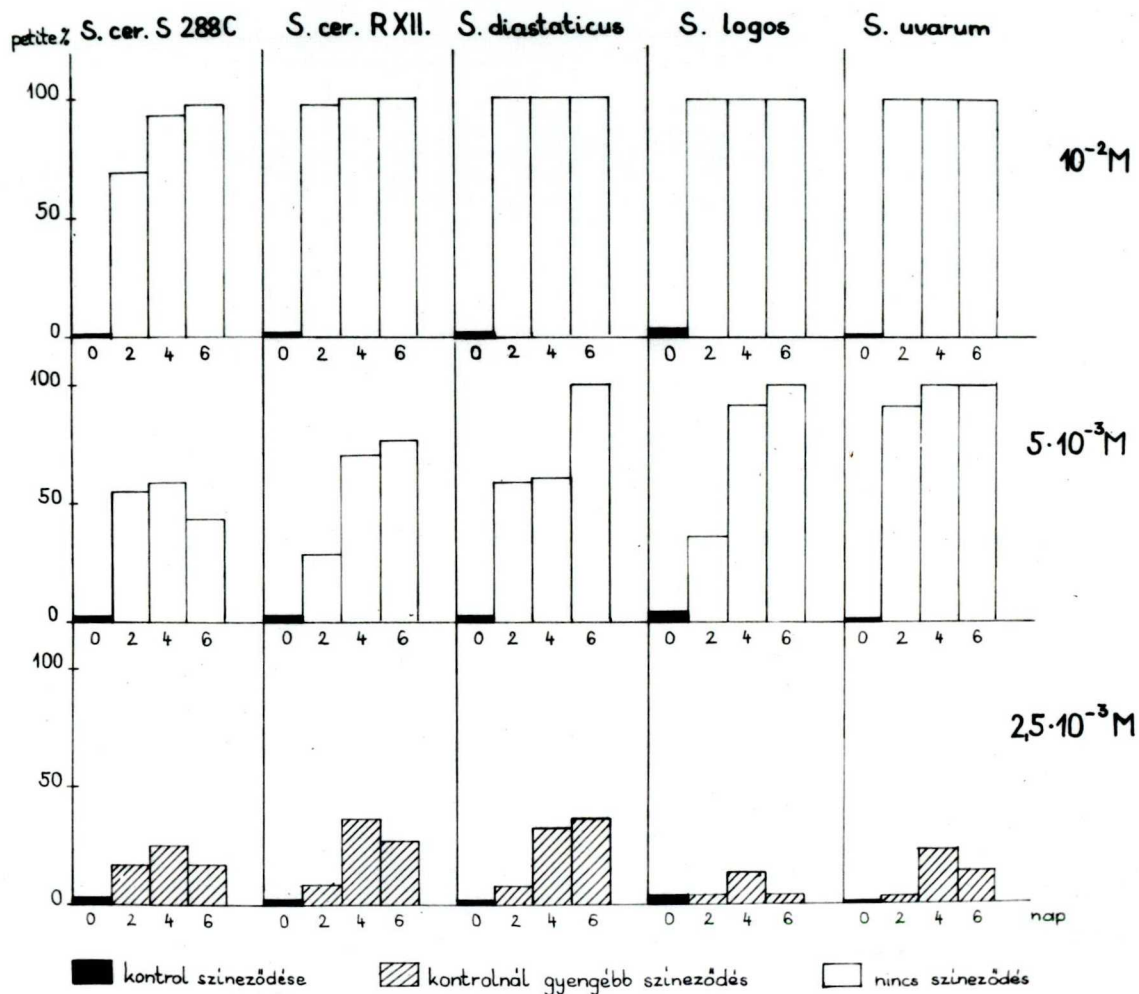
- jel a TV-redukáló képesség teljes hiányát jelenti /nincs festődés/

+ jelek száma a tenyészetek festődésével arányos



3. diagram: Az OTC RD-mutáns indukáló hatékonysága a *Saccharomyces cerevisiae* S288c, RXII, *Sacch. diastaticus*, *logos* és *uvarum* törzsekben különböző antibiotikum koncentrációknál a hatásidő függvényében.

Chlortetracyclin (CTC)



4. diagram: A CTC RD-mutáns indukáló hatékonysága különböző antibiotikum koncentrációknál a hatásidő függvényében a *Saccharomyces cerevisiae* S288c, RXII, *Sacch. diastaticus*, *logos* és *uvarum* törzsekben.

$5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ koncentrációban a CTC még jelentős RD-mutáns indukáló aktivitással rendelkezik. A Sacch. diastaticus, logos és uvarum törzseknél 100% petite gyakoriságot eredményezett, a Sacch. cer. S288c-nél 59%, az RXII-nél pedig 76% volt a maximális petite arány.

Az antibiotikum mindkét koncentrációban valamennyi törzsenél a formazánképző aktivitás teljes gátlását okozta.

$2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ koncentrációban a maximális RD-mutáns produkció a Sacch. cer. RXII-nél és a Sacch. diastaticusnál 36%, a Sacch. logosnál és uvarumnál 13 ill. 23%, a Sacch. cer. S288c-nél pedig 25% volt. Az antibiotikum ezen koncentrációjánál a formazánképzés gátlásának csökkenése figyelhető meg.

3/ Az etidiumbromid /RD-mutáns indukáló hatékonysága különböző Saccharomyces fajoknál

Az etidiumbromid /EB/ mutagén hatásából következik, hogy lényegesen /nagyságrendekkel/ alacsonyabb koncentrációban képes az élesztők légzésének gátlására illetve cytoplazmatikus petite mutáció indukálására, mint a fehérjeszintézisgátló antibiotikumok. Ugyancsak alacsonyabb koncentráció szükséges az élesztők növekedésének gátlásához is.

törzs	minimális gátló koncentráció $\mu\text{g/ml}$	100% petite mutáns indukció	
		$\mu\text{g/ml}$	nap
S.cer. S288c	60	5	3
S.cer. RXII	20	1	1
S. diastaticus	100	10	3
S. logos	80	5	2
S. uvarum	60	5	1

5. táblázat: Az etidiumbromid gátló és petite mutáns indukáló hatékonysága a Sacch. cer. S288c, RXII, diastaticus, logos és uvarum törzsekben. Petite mutánsok diagnózisa IV-vel való festődés alapján.

Az 5. táblázat feltünteti a vizsgált öt élesztőtörzs növekedésének gátlásához ill. a 100% petite mutáció indukálásához szükséges minimális EB koncentrációt és a kezelési napok számát. A min. gátló koncentráció törzsenként különböző, 20-100 $\mu\text{g/ml}$ között változik. Ugyancsak különböző a 100% petite indukáló koncentráció is, az előbbinél általában egy nagyságrenddel alacsonyabb, 1-10 $\mu\text{g/ml}$ között van, és nagyjából arányos a gátló koncentrációval. A szükséges kezelési napok száma 1-3 közötti érték.

4/ Antibiotikumokkal indukált, TV-redukcióra képtelen telepek szénforrás hasznosítása

A vizsgált antibiotikumok RD-mutáns indukáló képességét a TV-vel nem festődő telepek szénforrás hasznosítása is alátámasztja. Ezeknek a kismolekulájú vegyületeknek és cukrok-nak a felhasználásához a mitokondrium sértetlensége szükséges, ezek az ún. nemfermentálható szénforrások. A vizsgálatok eredményét a 6. táblázat tartalmazza.

törzs		TV 25 $\mu\text{g/ml}$	glükóz 1%	glicerin 1%	etanol 1%	acetát 1%	laktát 1%	galaktóz 1%	malaktóz 1%
Sacch.cer. RXII	grande	+	+	+	+	+	+	+	+
	petite 1	-	+	-	-	-	-	-	-
	petite 2	-	+	-	-	-	-	-	-
	petite 3	-	+	-	-	-	-	-	-
Sacch.cer. S288c	grande	+	+	+	+	+	+	+	+
	petite 1	-	+	-	-	-	-	-	-
	petite 2	-	+	-	-	-	-	-	-

6. táblázat: Antibakteriális fehérjeszintézisgátló antibiotikumokkal indukált, TV-redukcióra képtelen

telepek szénforrás hasznosítása. A + jel a szénforrás jelenlétében történő növekedést illetve TV esetében szineződést jelent. A - jel a növekedés illetve a festődés hiányát jelzi.

A kapott adatok azt mutatják, hogy a TV-vel nem festődő telepek ezeket a szénforrásokat nem képesek hasznosítani, míg a normális légzésű telepek ezeken a szénforrásokon jól nőnek.

5/ Petite negatív élesztők reagálása az antibiotikus és etidiumbromidos kezelésre

Vannak ún. petite negatív élesztők, amelyekből az eddigi eljárásokkal még nem sikerült citoplazmatikus RD-mutánsokat létrehozni. Az indukálható Saccharomyces fajoknál jól bevált EM-nel, OTC-vel és CTC-vel megpróbáltunk ezeknél az élesztőknél is RD-mutációt indukálni. A kezelés során mindhárom antibiotikumot $10^{-2}M$ koncentrációban alkalmaztuk, és a tenyésztést a táptalaj felületén végeztük. A megvizsgált élesztők a Sacch. rouxii Saccharomyces ludwigii, Schizosacch. pombe, Candida albicans, Dekkeromyces fragilis, Hansenula anomala és Rhodotorula mucilaginosa voltak. Az antibiotikus kezelés azonban nem vezetett eredményre, egyik törzsben sem sikerült RD-mutánsokat létrehozni, bár mindhárom antibiotikum erősen lecsökkentette a tenyészetek növekedését és redukálós kapacitását, az antibiotikumok jelenlétében a tenyészetek nem vagy alig szineződtek. Ugyancsak eredménytelen volt a fenti élesztőknél az etidiumbromidos kezelés is.

6/ Különböző Saccharomyces fajok petite mutánsainak összehasonlítása a mitokondriális DNS tartalom alapján.

a/ Az élesztők mag és mt-DNS-ének CsCl fajsúlygrádiensben történő festésére és elválasztására alkalmas fluoreszkáló festékek

A DNS-hez kötődő fluoreszkáló festékek közül az etidiumbromidot, DAPI-t és a Hoechst 33 258 sz. vegyületet próbáltuk ki élesztők mag- és mt-DNS-ének CsCl fajsúlygrádiensben történő festésére és elválasztására /3., 4. ábra/. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen változás következett be az antibiotikumokkal indukált petite mutánsoknál a mt-DNS mennyiségében ill. fajsúlyában. Az "Anyagok és módszerek" fejezetben ismertetett irodalmi adatok alapján az EB-ot 460, a DAPI-t pedig 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmaztuk. A Hoechst 33258 sz. vegyület optimális koncentrációja ugyancsak 200 $\mu\text{g/ml}$ -nek bizonyult.

A háromféle festéket abból a szempontból összehasonlítva, hogy azonos protoplasztaszám esetén melyik alkalmazásakor jobb a mag- és mt-DNS elválása, a DAPI és a Hoechst 33 258 egyaránt jobbnak bizonyult az EB-nál. EB alkalmazásakor ugyanis a kétféle DNS sávja nagyon közel helyezkedik el egymáshoz és az elválás nem elég éles /képmelléklet 4., 5. kép/. A három festék érzékenységét összehasonlítva ugyancsak egyformán jobbnak bizonyult a DAPI és a Hoechst 33 258 sz. vegyület, mint az EB. Míg EB alkalmazásakor a mt-DNS sávja a protoplasztok ötszörös hígítása esetén már alig látható, a DAPI és a Hoechst 33 258 sz. vegyület esetében a mt-DNS sáv még a protoplasztok 25-szörös hígítása esetén is jól látható. Ezt azt jelenti, hogy elfogadva azt

a feltételezést, miszerint egy élesztősejtben kb. 50 mt-DNS molekula található, a módszer alkalmazásával kimutathatjuk a sejtenkénti két mt-DNS molekulát is.

Ez a módszer azonban nem alkalmas a DNS fajsúlyának meghatározására, mivel az alkalmazott festékek /valószínűleg a kötődés mértékének arányában /megváltoztatják annak fajsúlyát. Ez abból látható, hogy az egyes festékeknel mag- és mt-DNS sávja különböző magasságban helyezkedik el a CsCl grádiensben.

b/ Antibakteriális antibiotikumokkal indukált petite mutánsok mt-DNS-e

A leghatékonyabb petite induktornak bizonyult két antibiotikummal, az EM-nel és a CTC-nel indukált petite mutánsok közül véletlenszerű kiválasztási alapon megvizsgáltuk néhány petite mutáns mt-DNS-ét CsCl fajsúlygrádiens centrifugálással.

Az EM-nel indukált petite mutánsok közül az öt élesztőtörzse egy-egy mutánsát analizáltuk. Közülük a Sacch. cer. S288c mutánsa kivételével valamennyi tartalmazott mt-DNS-t, melynek denzitása vagy azonos volt a grande-ével vagy kisebb volt annál, az eltérés azonban különböző mértékű volt.

A CTC-nel indukált petite mutánsok közül a Sacch. cer. S288c, S. diastaticus és uvarum 5-5 petite mutánsának mt-DNS-ét analizáltuk Hoechst 33 258 sz. vegyület /CsCl fajsúlygrádiensben /7. táblázat, képmelléklet 6-8. kép/.

törzs	grande	petite				
		CTC 1	CTC 2	CTC 3	CTC 4	CTC 5
S.cer. S288c	+	-	-	-	-	-
S.diastaticus	+	+/=	+/=	+/=	*/<	+/<
S. uvarum	+	+/<	+/<	+/<	+/<	*/<

7. táblázat: A sacch. cer. S288c, S. diastaticus és uvarum grande és CTC-nel indukált petite mutánsainak Hoechst 33 258 sz. vegyület /CsCl fajsúly-grádiens centrifugálással analizált mt-DNS-e. + ill. - jel a mt-DNS jelenlétét ill. hiányát, = ill. < jel pedig a grande-ével azonos ill. annál kisebb mt-DNS fajsúlyt jelöl.

A három grande törzs mag- és mt-DNS-ének fajsúlya azonos volt, a petite mutánsok azonban heterogén képet mutattak. A S. cer. S288c törzs valamennyi petite mutánsánál hiányzott a mt-DNS, a S. diastaticus és uvarum esetében pedig valamennyi petite mutáns tartalmazott mt-DNS-t, melynek denzitása vagy azonos volt a grande-ével /S. diastaticus CTC 1, CTC 2, CTC 3/ vagy kisebb volt /S. diastaticus CTC 4, 5, S. uvarum CTC 1-5/. Az eltérés mértéke azonban, még azonos grande anyatörzs esetén is, különböző volt.

E r e d m é n y e k é r t é k e l é s e

A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy bizonyos antibiotikumok, amelyek a bakteriális fehérjeszintézist riboszomális szinten gátolják, a *Saccharomyces* genus különböző fajaiban - a mitokondriális fehérjeszintézis gátlása révén - különböző hatékonysággal RD-mutációt indukálnak.

Az antibiotikumok mutánsindukáló hatékonyságának vizsgálatánál két módszert alkalmaztunk. Az egyik módszer szerint az indukciót tápoldatban, míg a másik esetben szilárd táptalaj alkalmazásával, felületen történő tenyésztéssel végeztük. A két módszer közül a második bizonyult jobbnak, és ennek alkalmazásával a hatékony antibiotikumok RD-mutáns indukáló aktivitása magasabb volt.

Az antibiotikumok RD-mutáns indukáló hatékonyságának kvantitatív meghatározását a telepek TV-redukáló képessége alapján végeztük és ezen gyors és egyszerű RD-diagnosztizálási módszer megbízhatóságát a nem festődő telepek citokrom spektrumának és nemfermentálható szénforrások hasznosíthatóságának vizsgálata is megerősíti. Az RD-mutánsok citokrom-spektrumából ugyanis mindig hiányzik a citokrom a és b, valamint nemfermentálható szénforrások jelenlétében nem nőnek.

Az 50 S riboszóma alegységen ható antibiotikumok közül az EM, a 30 S-en hatók közül pedig a CTC bizonyult a leghatékonyabbnak.

A 10^{-2} M koncentrációban alkalmazott EM, OTC és CTC a *Sacch. cer.* S288c, R XII, *Sacch. diastaticus* és *uvarum* törzseknél egyaránt 100% körüli RD-mutációt indukált, míg a *Sacch. logos* a 100% mutációs gyakoriságot csak az OTC és CTC hatására produkálta, EM jelenlétében a mutációs gyakoriság csak 65%-ra emelkedett a tiznapos antibiotikumos kezelés folyamán.

$10^{-2}M$ koncentrációban mindhárom antibiotikum a TV-redukáló képesség teljes gátlását okozta.

Az alacsonyabb koncentrációkban alkalmazott EM és OTC RD-mutáns indukáló hatása erősen lecsökkent, illetve megszűnt, ezzel párhuzamosan a tenyészetek TV-redukáló képessége fokozódott, és az antibiotikum rezisztens telepek elszaporodását figyelhettük meg.

Ezzel ellentétben a CTC még alacsonyabb koncentrációban is jelentős RD-mutáns indukáló hatással rendelkezik.

$5 \cdot 10^{-3}M$ -nál 59-100% közötti, $2,5 \cdot 10^{-3}M$ -nál pedig 13-36% közötti a mutánsgyakoriság törzsektől függően. Ennél az antibiotikumnál rezisztens telepeket nem észleltünk. Az aminoglükozid antibiotikumok közül egyedül a NM-nek volt petite mutáns induktor hatása, $10^{-2}M$ koncentrációban alkalmazva 50 % átlatti RD-mutáns gyakoriságot eredményezett a vizsgált törzseknél. A SM, KM és GM teljesen hatástalan volt, még a tenyészetek reduktív kapacitását sem csökkentették.

A CP szintén hatástalannak bizonyult az RD-mutáns indukció szempontjából, bár a tenyészetek formazánképző aktivitását jelentősen lecsökkentette.

Az EB, amely közvetlenül a mt-DNS-be történő szelektív intorkalációja révén okoz petite mutációt, az antibakteriális antibiotikumoknál kb. három nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban $\mu g/ml$ /képes mind az öt élesztőnél 100% petite gyakoriságot létrehozni, viszonylag rövid, 1-3 napos inkubációs idő alatt. Ugyancsak alacsonyabb a minimális gátló koncentrációja is, a petite indukáló koncentrációnak kb. 10-szerese, és nagyjából arányos vele.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a leghatékonyabb petite induktornak bizonyult antibiotikumok, az EM, OTC és CTC, valamint az EB RD-mutáns indukáló hatását nyolc, eddig petite negatívnak bizonyult élesztő törzsenél:

/Sacch. rouxii, Saccharomyces ludwigii, Schizosaccharomyces pombe, Candida albicans, Dekkeromyces fragillis, Hansenula anomala és Rhodotorula mucilaginosa/, ezekből ugyanis az eddig nem sikerült RD-mutánsokat létrehozni. A mutánsindukció azonban ezekkel az antibiotikumokkal sem sikerült, egyik törzsnél sem észleltünk petite mutációt.

Az EM-nel és CTC-nel indukált petite mutánsok DNS-ét fluoreszcens festék /CsCl fajsúlygrádiensben szeparálva megvizsgáltuk, hogy ezek a mutánsok tartalmazzak-e mt-DNS-t, és ha igen, ennek fajsúlya megváltozott-e a grande törzshöz viszonyítva. A Saccharomyces cer. S288c petite mutánsai közül sem az EM-nel, sem a CTC-nel indukált mutánsok nem tartalmaztak kimutatható mennyiségben mt-DNS-t, ezek ún. $\varnothing^0$ mutánsok voltak. A többi megvizsgált petite törzs mind tartalmazott mt-DNS-t, melynek fajsúlya vagy azonos volt a grande-ével vagy annál kisebb volt, az eltérés azonban még azonos grande anyagörzs esetén is különböző volt. Ezek ún. $\varnothing^-$ mutánsok voltak.

Ugy tűnik tehát, hogy a petite mutánsoknál a mt-DNS degradációjának mértéke tehát nem elsősorban az alkalmazott induktortól függ, sokkal inkább az illető élesztőtörzs mt-DNS-ének stabilitásától illetve labilitásától.

I r o d a l o m

- Bachofen, V., Schweyen, R. J., Wolf, K. and Kaudewitz, F. /1972/ Z. Naturforsch., 27,252.
- Beijerinck, M. W. /1889/ Arch. Néderl. Sci., 23,367.
- Bernardi, G., Carnevali, F., Nicolaieff, A., Piperno, G. and Tecce, G. /1968/ J. Mol. Biol., 37,493.
- Bernardi, G., Faures, M., Piperno, G. and Slonimski, P. P. /1970/ J. Mol. Biol., 48,23.
- Bernardi, G., Piperno, G. and Fonty, G. /1972/ J. Mol. Biol., 65,173.
- Carnevali, F., leoni, L., Morpugo, G. and Conti, G. /1971/ Mutation Res., 12,357.
- Casey, J. W., Huey-Juang Hsu, Getz, G. S., Rabinowitz, M. and Fukuhara, H. /1974/ J. Mol. Biol., 88,735.
- Castelletto de Fanchiotti, L. A., Janes, G. R. N. and Bradbury, S. /1971/ Histochemie, 27,28.
- Clark-Walker, G. D. and Linnane, A. W. /1966/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 25,28.
- Denhardt, D. T., and Kato, A. C. /1973/ J. Mol. Biol., 77,479.
- Elliott, W. H. /1963/ Biochem. J., 86,562.
- Ephrussi, B.: Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms. Clarendon Press, Oxford.1953.
- Goldring, E. S., Grossman, L. J., Krupnick, D., Cryer, D. R. and Marmur, J. /1970/ J. Mol. Biol., 52,323.
- Gottlieb, D. and Shaw, P. D.: Antibiotics II. Mechanism of action. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1967.
- Lindegren, C. C., Ogur, M., Pittman, D. D. and Lindegren, G. /1957/ Science, 126,399.
- Linnane, A. W., Haslam, J. M., Lukins, H. B. and Nagley, P. /1972/ Ann. Rev. Genetics 163.
- Mahler, H. R. and Bastos, R. N. /1974/ FEBS Letters, 39,27.
- Markovitch, H. /1951/ Ann. Inst. Pasteur, 81,452.
- Michael, R., Schweyen, R. J. and Kaudewitz, F. /1971/ Molec. gen. Genetics, 111,235.

- Morita, Mifuchi, T. /1970/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 38,191.
- Mounolou, J. C., Jakob, H. and Slonimski, P. P. /1966/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 24,218.
- Nagai, S., Yanagishima, N. and Nagai, H. /1961/ Bact. Rev., 25,404.
- Nagley, P. and Linnane, A. W. /1970/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 39,989.
- Nagley, P. and Linnane, A. W. /1972/ J. Mol. Biol., 66,181.
- Nagley, P., Gingold, E. B., Lukins, H. B. and Linnane, A. W. /1973/ J. Mol. Biol., 78,335.
- Newton, B. A. in Hochster, R. M., Quastel, J. H.: Metabolic inhibitors, Vol. 2.,285. Academic Press, New York, London,1963.
- Ogur, M., St. John, R. and Nagai, S. /1957/ Science, 125,928.
- Paelotti, J. and LePecq, J. B. /1971/ J. Mol. Biol., 59,43.
- Paelotti, C., Couder, H. and Guérineau, M. /1972/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 48,950.
- Pestka, S. /1971/ Ann. Rev. Microbiol., 25,487.
- Preer, J. R. Jr. /1971/ Ann. Rev. Genetics, 5,361.
- Puglisi, P. P. and Algeri, A. /1971/ Molec. gen. Genetics, 110,11.
- Raut, C. /1954/ J. Cellular. Comp. Physiol., 44,463.
- Richardson, J. P. /1973/ J. Mol. Biol., 78,703.
- Schatz, G. /1964/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 12,448.
- Schwab, R., Sebald, M. and Kaudewitz, F. /1971/ Molec. gen. Genetics, 110,361.
- Slonimski, P. P. /1952/ Thesis Faculté des Sciences Paris.
- Slonimski, P. P. /1953/ Formation des enzymes respiratoires chez la levure, Masson, Paris.
- Slonimski, P. P., Perrodin, G. and Croft, J. H. /1968/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 30,232.
- Tewari, K. K., Jayaraman, J. and Mahler, H. R. /1965/ Biochem. Biophys. Res. Commun., 23,56.
- Tomchick, R. and Mandel, H. G. /1964/ J. gen. Microbiol., 36,225.
- Waring, M. J. /1965/ J. Mol. Biol., 13,269.

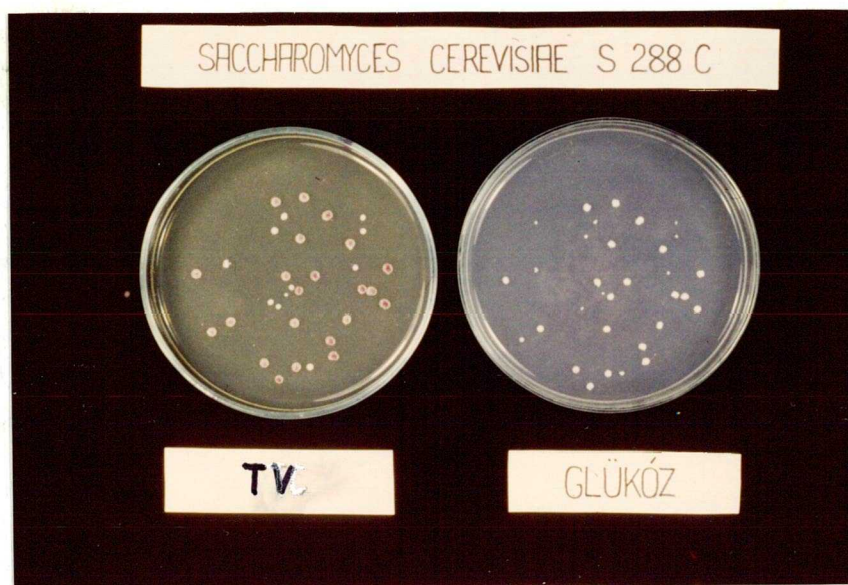
Waring, M. J. /1970/ J. Mol. Biol., 54,247.

Williamson, D. H., Maroudas, N. G. and Wilkie, D. /1971/
Molec. gen. Genetics,111,209.

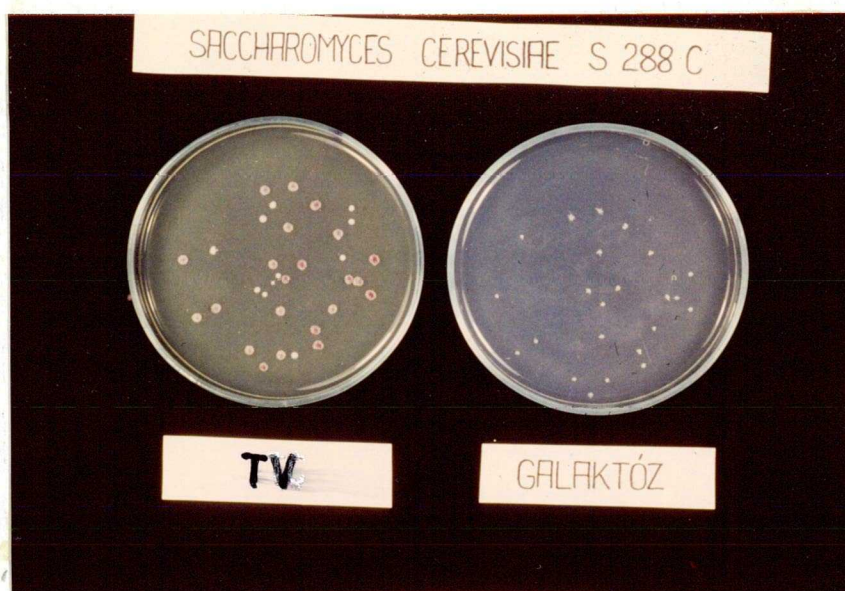
Williamson, D. H. and Fennell, D. J. in Methods in cell
biology. /edit. by Prescott, D./ Academic Press, New York. 1974.

Wintersberger, E. /1965/ Biochem. Z., 341, 409.

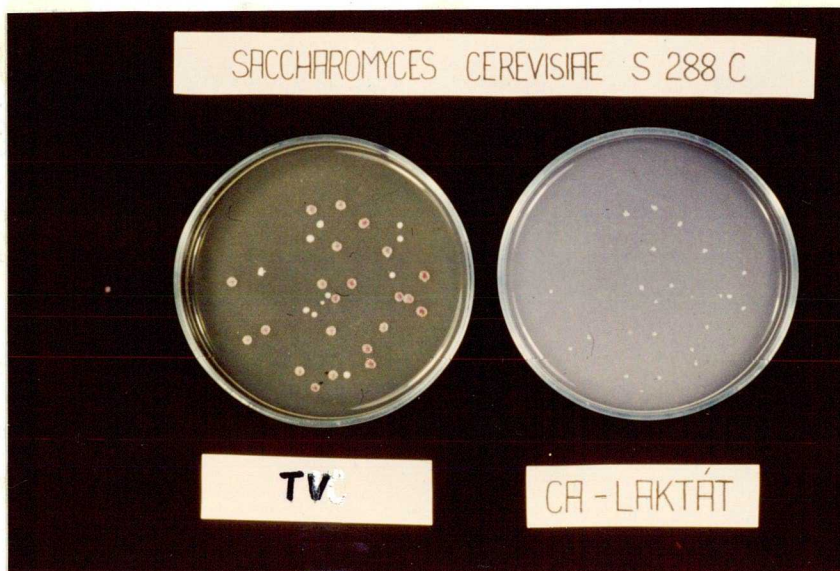
KÉPMELLÉKLET



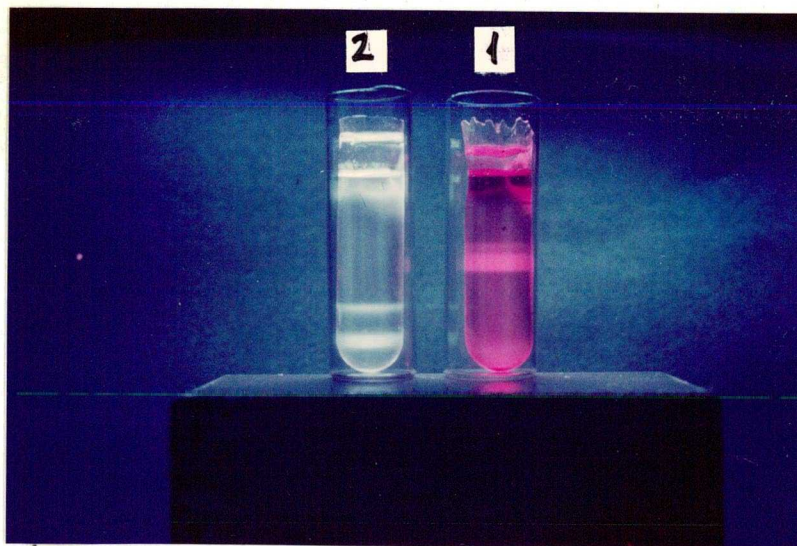
1. kép: Grande és petite telepek glükóz tartalmu táptalajra replikázva tetrazólium violet festék jelenlétében /TV/ill. anélkül /glükóz/.
Nagy, ibolya színű telepek: grande,
Kicsi, fehér telepek: petite



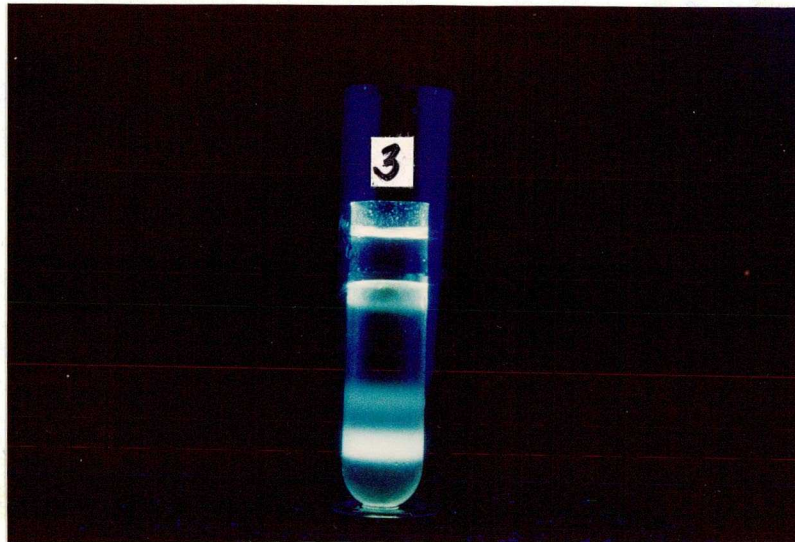
2. kép: Grande és petite telepek glükózt és TV-t, valamint galaktózt tartalmazó táptalajra replikázva.
Grande telepek mindkét szénforráson nőnek, petite telepek a galaktózt nem képesek felhasználni szénforrásként.



3. kép: Grande és petite telepek glükózt és TV-t, valamint Ca-laktátot tartalmazó táptalajra replikázva. Grande telepek mindkét szénforráson nőnek, petite telepek a Ca-laktátot nem képesek felhasználni szénforrásként.



4. kép: /magyarázat az 5. kép után/



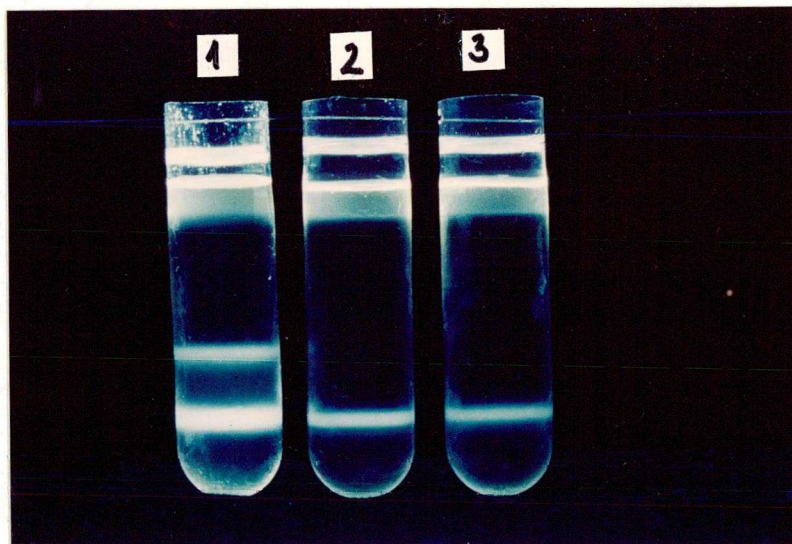
5. kép

4., 5. kép: *Saccharomyces cerevisiae* S288c grande törzs sejtmag és mitokondriális DNS-ének szeparálása fluoreszkáló festék/CsCl fajsúlygrádiensben.

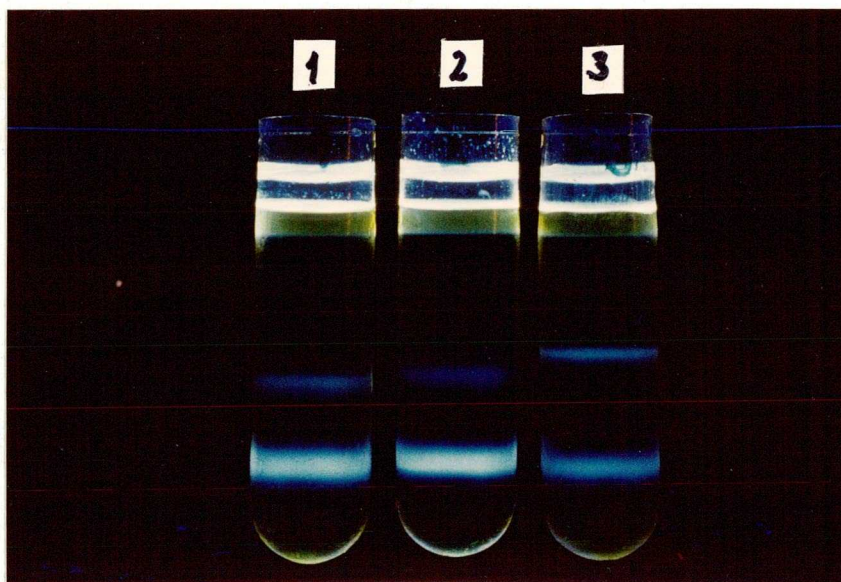
1. cső: 460 $\mu\text{g/ml}$ etidiumbromid

2. cső: 200 $\mu\text{g/ml}$ DAPI

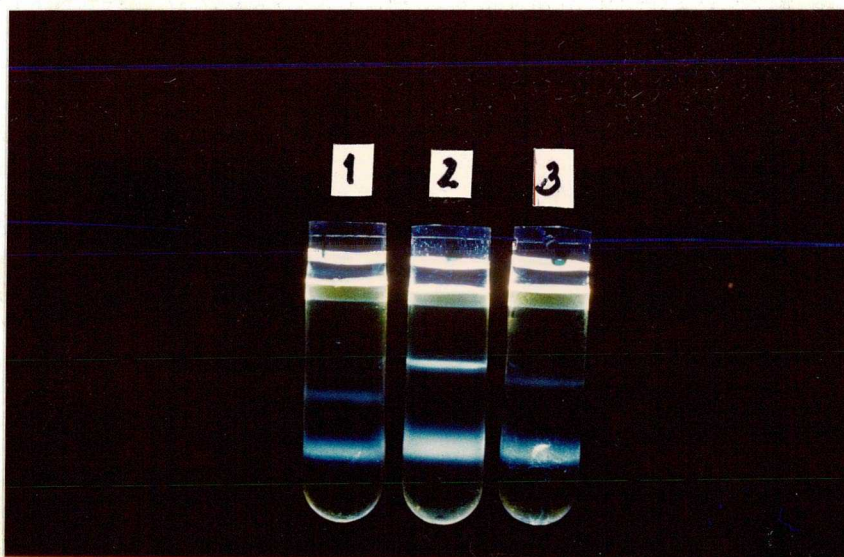
3. cső: 200 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33 258. sz. vegyület
felső sáv: mitokondriális DNS
alsó sáv: sejtmag DNS



6. kép: *S. cer.* S288c grande /1. cső/ és két petite /2. cső CTC 1, 3. cső CTC 2/ törzsének DNS-e Hoechst 33 258/CsCl fajsúlygrádiensben szeparálva.



7. kép: *S. diastaticus grande* /1. cső/ és két petite /2. cső CTC 1, 3. cső CTC 5/ törzsének DNS-e Hoechst 33 258/ CsCl fajsúlygrádienseben szeparálva.



8. kép: *S. uvarum grande* /1. cső/ és két petite /2. cső CTC 1, 3. cső CTC 2/ törzsének DNS-e Hoechst 33 258/ CsCl fajsúlygrádienseben szeparálva.

Köszönetet mondok Dr. Ferenczy Lajos tanszékvezető docensnek, aki doktori értekezésem elkészítését lehetővé tette, elméleti és gyakorlati tanácsaival munkámat messzemenően segítette. Ugyancsak megköszönöm Romvári Magdolna laboránsnak a kísérleti munkában, Nagy Lajos Gergely technikusnak pedig a fotóanyagok elkészítésében nyújtott segítségét.