

1. Wstęp

Niektóre szczepy drożdży wydzielają do podłoża substancję białkową, która jest toksyczna w stosunku do innych drożdży tego samego lub innego gatunku, a czasem także reprezentantów innych rodzajów. Substancja ta nazywana jest popularnie czynnikiem „killerowym”, toksyną „killerową”, bądź białkiem „killerowym”. Szczepy drożdży zostały podzielone na wykazujące fenotyp: killerowy, neutralny lub wrażliwy (tab. 1).

Tabela 1

Klasyfikacja fenotypów killerowych dla rodzaju *Saccharomyces cerevisiae*

Fenotyp	Właściwości
$K_1^+ R_1^+$	szczepy odporne na wytworzone przez siebie białko killerowe typu K1, wrażliwe na drożdże produkujące toksynę typu K2 i K3
$K_2^+ R_2^+$	szczepy odporne na wytworzone przez siebie białko killerowe typu K2, wrażliwe na drożdże produkujące toksynę typu K1 i K3
$K_3^+ R_3^+$	szczepy odporne na wytworzone przez siebie białko killerowe typu K3, wrażliwe na drożdże produkujące toksynę typu K1 i K2
$K^- R^+$	fenotyp neutralny, szczepy nie produkują białka killerowego, ale są na nie odporne
$K_1^{++} R_1^+$	fenotyp superkillerowy, szczepy produkują bardziej aktywną lub bardziej stabilną toksynę typu K1
$K_1^+ R_1^w$	fenotyp tzw. samobójczy, szczepy produkują białko killerowe i wykazują obniżoną na nie odporność
$K^- R^-$	szczepy wrażliwe nie produkują białka killerowego i są na nie wrażliwe

Drożdże killerowe są najczęściej odporne na działanie swojej własnej toksyny. Fenomen killerowy opisany po raz pierwszy przez Makower i Bevan w 1963 r. (1), jest szeroko rozpowszechniony zarówno wśród drożdży przechowywanych w Kolekcjach Czystych Kultur, jak i wśród drożdży występujących w środowisku naturalnym. Dokładna funkcja i rola toksyny killerowej w naturalnych zbiorowiskach drożdży nie jest znana. Wielu autorów sugeruje, że odgrywa ona ważną rolę w ekologii drożdży (2,3), będąc potencjalnym mechanizmem współzawodnictwa, w którym produkcja składników toksyny killerowej uniemożliwia konkurentom zdominowanie danego środowiska (4). Białko killerowe wydaje się najbardziej odpowiednie do tego zadania, gdyż maksymalna jego produkcja następuje w fazie wzrostu logarytmicznego, kiedy to zapasy substancji pokarmowych są obfite, a pH podłoża odpowiednie. Fenomen killerowy spowodowany jest w kooperacji z genami jądrowymi, przez podobne do wirusów cząstki oznaczone jako VLP

(*virus like particles*) występujące w cytozolu. Podobieństwo polega na tym, że genom cząstek VLP, zwykle podwójnie skręcony heliks kwasu rybonukleinowego (dsRNA), jest zamknięty (5,6).

Jednakże podwójnie skręcony RNA nie zawsze jest wyznacznikiem charakteru killerowego. U drożdży *Kluyveromyces lactis* informacje genetyczne niezbędne do ujawnienia fenotypu killerowego przenoszone są przez liniowy dsDNA (7,8).

Wirusopodobne cząstki mogą być przenoszone przez hybrydyzację, fuzję protoplastów lub cytotokację. Zauważyć tu należy podobieństwo ich właściwości do plazmidów, zaś budowa do wirusów i dlatego czynnik determinujący fenotyp killerowy jest często nazywany wirusopodobnym plazmidem lub mykowirusem (3).

Dotychczas przeprowadzono wiele badań poświęconych poznaniu natury toksyny killerowej. Białko to jest wrażliwe na temperaturę, enzymy proteolityczne (9,10), a optymalnym pH do jego działania jest przedział 4,2–4,7. Optymalna temperatura biosyntezy toksyny leży w przedziale 20–24°C (11). Toksyna killerowa jest wrażliwa na substancje chemiczne, takie jak np. cykloheksymid czy oranż akrydynowy.

Fenomen killerowy najlepiej został opisany dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, u których został odkryty. Rozpoznano po 11 rodzajów dla fenotypu: killerowego i 11 rodzajów fenotypu odpornego na działanie czynnika killerowego (3,12,13). U drożdży rodzaju *Saccharomyces sp.* mogą występować trzy typy fenotypu killerowego: K1, K2 i K3. Typ K1 został znaleziony wśród drożdży przechowywanych w Kolekcjach Czystych Kultur (1), drożdże z typem killerowym K2 izolowane były z różnych środowisk fermentacyjnych, m.in. jako zanieczyszczenia w ciągłej produkcji piwa (14,15). Typ K3 został znaleziony u drożdży *Saccharomyces capensis* 761 (12). Występowanie jednego lub kilku gatunków drożdży killerowych stwierdzono ponadto u następujących rodzajów: *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Kloeckera* i *Cryptococcus* (4,12,16,17,18,19,20,21,22). Toksyny tych drożdży różnią się między sobą optymalnym pH działania, stabilnością temperaturową, odpornością na działanie enzymów proteolitycznych oraz niektórych innych substancji chemicznych. Są one względem siebie antagonistyczne. Badania wzajemnego antagonizmu wykonane na typach K1 i K2 dowodzą, że szczepy te zostały wyselekcjonowane naturalnie, w drodze ewolucji do konkurencji w różnych niszach ekologicznych (23).

Fenotyp killerowy wykrywany jest z użyciem podłoża odżywczego o pH 4,2–4,7, zawierającego błękit metylenowy (0,003%) i zagęszczonego agarem (2%), przy inkubacji w 20–24°C. Badany szczep umieszczany jest na powierzchni podłoża, zaś szczep wrażliwy wysiewany jest wgłębnie. Strefa hamowania wokół kolonii badanego szczepu świadczy o jego killerowym charakterze (9). O innej metodzie wykrywania czynnika killerowego z użyciem barwników fluorescencyjnych (np. rodaminy B) donoszą Vondrejs i in. (24).

2. Determinacja fenotypu killerowego przez dsRNA

Czynnik killerowy determinowany jest występowaniem w cytozolu komórek drożdży splecionego w heliks kwasu rybonukleinowego (dsRNA). Ze względu na wielkość i funkcję wyróżnia się zasadniczo dwa typy dsRNA oznaczone jako M- i L-dsRNA, które dodatkowo są jeszcze różnicowane między sobą. U niektórych drożdży killerowych zaobserwowano obecność mniej ważnych typów dsRNA oznaczonych jako T-, W-, XL- oraz S-dsRNA (3,25), (tab. 2).

Produkcja toksyny killerowej i odporność na nią kodowane są przez M-dsRNA. Wyróżniono kilka rodzajów M-dsRNA: M₁-dsRNA, M₂-dsRNA i M₃-dsRNA, które odpowiadają za produkcję toksyny killerowej odpowiednio typów K1, K2 i K3 (3,12).

Molekuły M-dsRNA zamknięte są w wirusopodobnych cząstkach (VLP) obecnych w dużej liczbie kopii w komórce.

Największy z dsRNA, oznaczony jako L-dsRNA występuje u wszystkich izolowanych szczepów drożdży killerowych oraz u większości szczepów wrażliwych na toksynę killerową. L-dsRNA

zamknięte jest również w wirusopodobnych cząstkach (3). Sommer i Wickner (26) pierwsi zaszgerowali istnienie co najmniej dwóch nie spokrewnionych rodzajów L-dsRNA. Plazmid killerowy M-dsRNA jest satelitą jednego z rodzajów L-dsRNA, co wskazuje, że replikacja M-dsRNA zależy od jego obecności w komórce. Drugi rodzaj L-dsRNA dzielący się na: L_B-, L_C- i L_{BC}-dsRNA jest niezależny od L_A-dsRNA i od M-dsRNA. Istnieją co najmniej 2 warianty L_A-dsRNA: L_{A1}- i L_{A2}-dsRNA. L_{A1}-dsRNA izolowano z dzikich szczepów killerowych typu K1. Produktem translacji *in vitro* L_{A1}-dsRNA jest białko, które stanowi 95% białka cząstki VLP.

Tabela 2

Typy dsRNA u drożdży killerowych gatunku *S. cerevisiae*

Typ dsRNA	Opis
M ₁	1,9 kb dsRNA; determinant fenotypu K ₁ ⁺ R ₁ ⁺
M ₂	1,7 kb dsRNA; determinant fenotypu K ₂ ⁺ R ₂ ⁺
M ₃	1,5 kb dsRNA; determinant fenotypu K ₃ ⁺ R ₃ ⁺
S ₃	0,73 kb dsRNA; powstaje z M1 przez wewnętrzną delecję
L _A	4,7 kb dsRNA; wymagany do utrzymania M ₁ - lub M ₂ -dsRNA w komórce
L _{A1}	4,7 kb dsRNA; wariant L _A -dsRNA kodujący kapsyd białkowy dla VLP zawierającego L _{A1} - i M ₁ -dsRNA
L _{A2}	4,7 kb dsRNA; wariant L _A -dsRNA kodujący białkowy kapsyd dla VLP zawierającego L _{A2} - i M ₂ -dsRNA
L _B , L _C , L _{BC}	4,7 kb dsRNA; znaleziony u większości killerów typu K1 i K2; nie są wymagane do utrzymania cząstek M ₁ - lub M ₂ -dsRNA w komórce; kodują kapsyd dla swego własnego VLP
T, W	2,7 kb dsRNA; drugorzędne typy dsRNA o nieznannej funkcji
XL	drugorzędny typ dsRNA o nieznannej funkcji, okazjonalnie znajdujący u killerów typu K1

Ustalono, że zamykanie się dsRNA jest niezbędne do utrzymania go w komórce oraz, że M₁-dsRNA jest satelitą L_{A1}-dsRNA jako źródła kapsydu – cząsteczki białkowej VLP. Cząsteczka białkowa VLP zamyka w sobie cząstki L_{A1}-dsRNA i M₁-dsRNA. L_{A2}-dsRNA koduje kapsyd białkowy u szczepów drożdży killerowych typu K2. L_{A1}- i L_{A2}-dsRNA wykazują wzajemną homologię w 20–30% w określonych regionach (3). Brak jest jakiegokolwiek homologii między cząstkami typu L_A-dsRNA, a L_B-, L_C- i L_{BC}-dsRNA. Cząstki L_B-, L_C- i L_{BC}-dsRNA są ze sobą bardzo blisko spokrewnione (w ok. 50%) i znajdują się u większości szczepów drożdży z czynnikiem killerowym typu K1 i K2. Stanowią one 5–10% całkowitej ilości dsRNA, chociaż wyizolowano również szczepy, które miały wyższą ich zawartość lub były ich pozbawione. L_B-, L_C- i L_{BC}-dsRNA nie są wymagane do utrzymania cząstek M₁- i M₂-dsRNA. Ich obecność związana jest z syntezą białka dla własnych cząstek VLP.

U wielu szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* obecne są inne nie spokrewnione ze sobą typy dsRNA oznaczone jako T- i W - dsRNA. Ich funkcja w systemie killerowym nie została jeszcze wyjaśniona, podobnie jak funkcja innej cząstki, oznaczonej jako XL-dsRNA, która była znajdowana okazjonalnie u drożdży killerowych typu K1. Cząsteczka S-dsRNA jest fragmentem M₁-dsRNA znajdującym się w recesywnych mutantów (3).

Zjawisko czynnika killerowego ma charakter plazmidowy, co zostało udowodnione dla drożdży killerowych typu K1, K2 i K3, lecz nie było badane dla innych typów drożdży killerowych. Szczepy drożdży posiadających toksynę killerową mogą tracić w określonych warunkach zdolność zabijania. Pozbawienie tej umiejętności, tzw. „leczenie”, następuje w:

- 1) czasie hodowli drożdży w podwyższonej temperaturze (ok. 30–40°C), (10);
- 2) obecności letalnej dawki cykloheksymidu w podłożu hodowlanym;
- 3) obecności letalnej dawki 5' -fluorouracylu w podłożu hodowlanym.

Zjawisko „gubienia” cząsteczki M-dsRNA zależy nie tylko od warunków zewnętrznych, lecz związane jest także z L_A-dsRNA. Naturalne warianty L_A-dsRNA przenoszą różne kombinacje genów *hok* (*helper of killer*), *nex* (*non excludable of M₂*) oraz *exl* (*excluder of M₂*), które mają różny wpływ na system killerowy (27).

Gen *hok* jest zdolny do wspierania replikacji mutantów w M₁-dsRNA o genotypie [KIL-sd₁] z wadliwym systemem replikacji. Wariant L_A-dsRNA przenoszący gen *hok* oznaczono jako L_{AH}-dsRNA. Gen *exl* powoduje usunięcie cząstki M₂-dsRNA. L_A-dsRNA z genem *exl* (wariant L_{AE}-dsRNA) lub z genami *hok* i *exl* (wariant L_{A-EH}-dsRNA) obecny u drożdży killerowych typu K1 powoduje „gubienie” M₂-dsRNA u drożdży typu K2 w przypadku krzyżowania tych typów.

„Zgubienie” M₂-dsRNA nie nastąpi, jeśli L_A-dsRNA wyposażony będzie w gen *nex* (wariant L_{A-HN}-dsRNA), (27). Zjawisko „gubienia” M₂-dsRNA następuje także bez udziału cząsteczek L_A-dsRNA, a związane jest z cząsteczką M₁-dsRNA. Podczas krzyżowania szczepów typu K1 i K2 molekula M₂-dsRNA zostaje całkowicie usunięta i obserwuje się tylko M₁-dsRNA (3).

Zachowanie, rozmnażanie i ekspresja cechy killerowej, jak też odporność na nią uzależnione są od wielu genów jądrowych, co zostanie omówione w pkt. 2.1.2.

2.1. Mutacje

2.1.1. Mutacje M-dsRNA

Mutacje w obrębie plazmidu M-dsRNA zmieniają standardowy fenotyp killera K⁺ R⁺ (tab. 1). Dotyczą one zarówno jakości, jak i ilości wydzielanej toksyny, odporności i replikacji M-dsRNA. Mutanty neutralne (genotyp [KIL-n₁]) były obserwowane wśród szczepów izolowanych ze środowisk naturalnych. Są one wadliwe w tej części M-dsRNA, która jest odpowiedzialna za kodowanie prekursora toksyny, lecz nie mają defektu w części odpowiedzialnej za odporność. Niektóre szczepy neutralne wydzielają toksynę killerową, jednakże jest ona nieaktywna z uwagi na fakt, że mutacja zmieniła sekwencję nukleotydów w kodującym ją M-dsRNA (3,28).

Inne jeszcze mutacje wpływają na ekspresję cechy odporności. Mutanty takie, zwane „samobójcami” produkują toksynę w normalnej ilości, lecz wykazują obniżoną odporność na nią w związku z defektem w regionie M-dsRNA, który determinuje odporność (28).

Po raz pierwszy mutanty powstałe w wyniku usunięcia pewnego odcinka dsRNA z M-dsRNA, oznaczonego jako S-dsRNA opisał Somers (29). Mutanty te, nazywane recesywnymi, charakteryzują się tym, że nie produkują toksyny killerowej, ale po skrzyżowaniu ze szczepami killerowymi dają niestabilne diploidy o fenotypie K⁺ R⁺, które stopniowo dzielą się dając fenotyp K⁻ R⁻. Ridley i Wickner (30) sugerują, że może to być spowodowane przez preferencyjną replikację S-dsRNA.

Tak zwane mutanty diploido-zależne charakteryzują się tym, że M₁-dsRNA występuje tylko w diploidalnych komórkach a/α. Utrzymanie tej cechy jest pod kontrolą genu *mat* (31).

2.1.2. Mutacje jądrowe

Fenotyp killerowy jest determinowany cząsteczkami dsRNA zlokalizowanymi w cząstkach VLP, wiadomo jednak, że istnieje wiele genów chromosomalnych wymaganych do replikacji, ekspresji M-dsRNA oraz odporności na działanie toksyny killerowej.

Znaleziono 30 genów jądrowych, których mutacje powodują utratę cząsteczki M₁-dsRNA. Geny te: *mak1*, *mak3* – *mak28*, *spe2*, *spe10* i *pet18* odpowiedzialne są również za replikację cząsteczki M₁-dsRNA i zamykanie jej w kapsydzie białkowym (3,32). Tylko niektóre z wymienio-

nych genów odpowiedzialne są za replikację L-dsRNA, są to: *mak3*, *mak10* i *pet18*. Inne geny jądrowe, tzw. geny ekspresji *kex1* i *kex2*, kontrolują ekspresję fenotypu killerowego, tj. produkcję toksyny killerowej. Mutanty *kex1* i *kex2* nie wydzielają toksyny, ale zachowują odporność na nią.

Szczepy drożdży killerowych K1 z mutacją w genie *rex* (gen odpornościowy) tracą odporność na swoją własną toksynę. Są to mutanty nazywane „samobójcami”. Jest to spowodowane prawdopodobnie przedwczesną aktywacją białka killerowego, lub degradacją czynnika odporności, albo taką modyfikacją hipotetycznego receptora membrany, która prowadzi do sytuacji, kiedy receptor nie jest chroniony przez wyznacznik odporności (33).

Ważną rolę odgrywają również geny, których mutacje wpływają na wzrost aktywności killerowej szczepów drożdży, tak zwanych superkillerów ($K^{++} R^{+}$). Mutacje tego typu dotyczą genów *ski*. Wykazano, że u wielu szczepów superkillerowych replikacja M_1 -dsRNA jest zależna od mutacji genów *ski* oraz od odporności cząstki L_{A-E} -dsRNA. Szczepy superkillerowe produkują bardziej stabilną toksynę, lub w wyniku wzrostu ilości kopii M_1 -dsRNA – większą ilość toksyny (3).

3. Produkcja i sposób działania toksyny killerowej

3.1. Biosynteza toksyny killerowej

M -dsRNA jest elementem genetycznym zawierającym niezbędne informacje dla syntezy białka killerowego. Składa się on z dwóch oddzielnych segmentów (1,0 i 1,6 kb), przy czym dłuższy segment koduje prekursor toksyny killerowej. Na matrycy M -dsRNA następuje synteza produktu przejściowego, składającego się z dwóch polipeptydów α i β (9,5 i 9,0 kDa). Części te są rozdzielone segmentem γ , który jest prawdopodobnie wyznacznikiem odporności, a poprzedza je N-końcowy segment δ . Hydrofobowy segment δ pozwala prekursorowi toksyny na przejście do reticulum endoplazmatycznego, gdzie następuje glikolizacja segmentu γ . Dalsze nieznaczne modyfikacje następują w aparacie Golgiego (zdefiniowane przez efekt mutacji *sec18* i *sec7*). Następnie, podczas transportu na zewnątrz komórki toksyna rozszczepiana jest przez specyficzne proteinazy. W ten sposób prekursor α i β toksyny połączone wiązaniem disiarczkowym tworzą aktywne białko killerowe, które łącznie z sekwencją γ wydzielane jest na zewnątrz komórki, dzięki połączeniu cząstek transportujących z membraną plazmatyczną. Przypuszcza się, że sekwencja γ poprzez reakcje z nie zdefiniowanymi receptorami toksyny killerowej w membranie cytoplazmatycznej odpowiada za odporność komórki. Przeznaczenie sekwencji δ jest w dalszym ciągu nieznanne (3).

3.2. Działanie toksyny killerowej

Sposób działania toksyny killerowej na wrażliwe szczepy drożdży był badany w wielu laboratoriach, dla różnych szczepów *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp.* oraz *Candida sp.* Po okresie wzrostu logarytmicznego białko killerowe łączy się z receptorami znajdujących się w ścianie komórkowej (34,35). Pierwszym receptorem toksyny typu K1, i prawdopodobnie toksyny typu K2, jest β -1,6-glukan (36), jednakże badania wykonane przez Schmitta i Radlera (37) wykazały, że również mannan może być pierwszym receptorem dla toksyny killerowej wyizolowanej z drożdży *S. cerevisiae* (28). Receptory toksyny znajdują się zarówno na ścianie komórkowej drożdży posiadających fenotyp wrażliwy, jak i killerowy. Obecność receptorów została wykazana za pomocą mutacji genów *kre1* i *kre2*, które powodowały znaczne obniżenie ilości toksyny związanej ze ścianą komórkową i modyfikowały skład β -1,6-glukanu (34). Wiązanie białka killerowego przez receptory, czyli pierwszy etap działania toksyny killerowej jest etapem, który odbywa się bez dostarczenia energii. Jednakże nie wiadomo do końca, czy odbywa się to tylko z udziałem składnika β , a składnik α jest w tym samym czasie przemieszczany do membran pla-

zmatycznych, czy też dokonuje się to w inny sposób. Następnie, działając na membrany plazmatyczne, toksyna powoduje śmierć komórki wrażliwej. Jest to drugi etap działania białka killerowego i zależy jest on od dostarczenia energii (38).

Białko killerowe działa na membrany powodując zniszczenie normalnego stanu elektrochemicznego gradientu jonów. Komórki drożdży wyczerpując ATP spontanicznie wydzielają jony K^+ , a stracie tej towarzyszy napływ ekwiwalentnej liczby protonów. Wydaje się zatem logiczne, że po dodaniu toksyny killerowej hamowany jest ruch jonów. Następuje to dzięki zwiększeniu przepuszczalności membran (39,40). Można przypuszczać, że formowane są kanały w dwuwarstwowej membranie fosfolipidowej umożliwiające penetrację jonów. Obserwacja ta została potwierdzona dla drożdży *Pichia kluyveri*, dla których formowanie kanałów było przypuszczalnie połączone z efektem letalnym (41).

Wpływ toksyny killerowej na komórki wrażliwe zależy od składu podłoża hodowlanego, a także od ich fazy wzrostu. Komórki z fazy stacjonarnej są relatywnie bardziej odporne na działanie toksyny. U komórek z fazy wzrostu logarytmicznego następuje zmiana przepuszczalności membran, która powoduje obniżenie pH w komórce, hamowanie procesów metabolicznych, uwolnienie jonów K^+ i ATP do podłoża, co w następstwie prowadzi do śmierci komórek (3,42). Komórki drożdży wrażliwych, będące pod wpływem białka killerowego można ochronić przed letalnym działaniem toksyny, jednakże jest to zależne od etapu, w którym znajdują się drożdże wrażliwe. W trakcie pierwszego etapu, tj. wiązania toksyny killerowej z receptorami znajdującymi się w ścianie komórkowej, ochrona ta polega na inkubacji w podłożu minimalnym, albo dodaniu jonów Ca^{++} do podłoża hodowlanego, bądź podniesieniu wartości pH czy też temperatury hodowli. Jeśli jednak toksyna przejdzie do drugiego etapu działania, tzw. nieodwracalnego, tj. nastąpią reakcje z membranami cytoplazmatycznymi komórki wrażliwej, te czynniki nie są już skuteczne. Przejście do stanu nieodwracalnego można utrudnić dodając do podłoża ADP (43).

Jest również wiele innych czynników, które mogą hamować produkcję białka killerowego. Do nich zaliczyć można: wysokie stężenie cukru, podwyższoną temperaturę oraz wartość pH (44).

4. Zastosowanie drożdży z czynnikiem killerowym

Aktywność killerowa reprezentuje mechanizm antagonistyczny wśród szczepów drożdży w trakcie spontanicznej fermentacji. Użycie winiarskich drożdży killerowych może mieć ogromne znaczenie w procesach fermentacyjnych, wymagających dokładnej kontroli mikrobiologicznej, z uwzględnieniem zapobiegania zanieczyszczeniom przez niepożądane szczepy drożdży (44). W 1988 r. Bussey i in. (23) donieśli o skonstruowaniu na drodze rekombinacji DNA szczepu drożdży killerowych K1-K2. W zależności od warunków środowiskowych zabijał on zarówno szczepy zawierające toksynę killerową K1, jak i K2, jeśli rosły one w hodowli mieszanej. Badania te mają również inną praktyczną wartość, a mianowicie pokazują one jak zachowują się drożdże killerowe w hodowlach mieszanych, co jest bardzo ważne dla procesów fermentacyjnych. Czynniki killerowe, jako mechanizm zwalczania zakażeń zwraca coraz większą uwagę badaczy. Salek, Schuettler i Zimmerman (45), przy użyciu elektroiniekcji, przenieśli killerowy dsRNA ze szczepu superkillerowego *S. cerevisiae* T158C do szczepów laboratoryjnych i przemysłowych. Proces ten znajdzie zastosowanie nie tylko w eliminacji zakażeń procesów fermentacyjnych, ale także w kontroli i ekspresji wirusów eukariotycznych, w studiach nad tworzeniem i wydzielaniem białek, a możliwe, że i w medycynie.

Drożdże zakażające procesy fermentacyjne i posiadające czynnik killerowy są bardziej niebezpieczne od tych, które go nie mają. Jest to głównie spowodowane ich zdolnościami zabijania, ale też współzawodnictwem w wykorzystaniu substratów. Przy użyciu technik hybrydyzacyjnych lub indukowanej fuzji protoplastów, badacze zajęli się konstruowaniem szczepów używanych zwłaszcza do produkcji piwa i wina, aby po przeniesieniu czynnika killerowego do niekillerowych szczepów przemysłowych skuteczniej zwalczać zakażenia (46,47). Janderova

i in. (48) skonstruowali na drodze fuzji protoplastów „mieszańca piwowarskiego” *Sacch. uvarum* – *Sacch. diastaticus*, który produkował nie tylko toksynę killerową mogącą zwalczać zanieczyszczenia szczepami *Saccharomyces sp.*, ale charakteryzował się również zdolnością degradacji dekstryn i skrobi, co jest ważną cechą technologiczną.

Innym zastosowaniem czynnika killerowego jest możliwość wykorzystania go jako markera przy selekcji regenerowanych produktów fuzji protoplastów. Vondrejs i in. (49) przeprowadzili fuzję dwóch szczepów *Sacch. cerevisiae* scharakteryzowanych jako $K^+R^+ his^-$ i $K^-R^- his^+$. Na podłożu minimalnym izolowano tylko hybrydy, które charakteryzowały się cechą R^+ przeniesioną ze szczepu posiadającego białko killerowe i his^+ od drugiego rodzica.

Zastosowanie tej techniki daje wiele korzyści:

- 1) fenotypy K^+ i R^+ mogą być testowane niezależnie,
- 2) cecha killerowa może być czasowym markerem do celów selekcyjnych, łatwym do eliminacji, gdy nie jest już użyteczna,
- 3) metoda ta może być stosowana wielokrotnie,
- 4) najczęściej używane techniki selekcyjne oparte na auktotrofii szczepów rodzicielskich nie mogą być stosowane do szczepów poliploidalnych, co uzasadnia stosowanie markerów killerowych,
- 5) technika oparta na wykorzystaniu czynnika killerowego jest wystarczająco uniwersalna i może być stosowana przy konstruowaniu przemysłowych szczepów drożdży (46,50).

5. Podsumowanie

Szczepy drożdży posiadające białko killerowe są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród szczepów izolowanych ze środowisk naturalnych, jak i u laboratoryjnych. Chociaż fenomen killerowy jest najlepiej poznany dla *Sacchromyces sp.*, występuje on również wśród innych rodzajów drożdży. Obecnie wielu badaczy zajmuje się nie tylko wyjaśnieniem istoty tego zjawiska, ale również możliwością jego wykorzystania.

Literatura

1. Mackower M., Bevan E. A., (1963), Proc. Int. Congr. Genet. XI 1, 203.
2. Stumm C., Hermans J. M. H., Middelbeek E. J., Croes A. F., De Vries J. M. L., (1977), Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 43, 125–128.
3. Tipper D. J., Bostian K. A., (1984), Microbiol. Rev., 48, 125–156.
4. Starmer W. T., Ganter P. F., Aberdeen V., Lachance M. A., Phaff H. J., (1987), Can. J. Microbiol., 33, 783–796.
5. Berry E. A., Bevan E. A., (1972), Nature (London), 239, 279–280.
6. Bevan E. A., Herring A. J., Mitchell D. J., (1973), Nature (London), 245, 81–85.
7. Gunge N., Tamazu A., Ozawa F., Sakaguchi K., (1981), J. Bacteriol., 145, 282–290.
8. Gunge N., (1983), Ann. Rev. Microbiol., 37, 253–276
9. Woods D. R., Bevan E. A., (1968), J. Gen. Microbiol., 51, 115–126.
10. Wickner R. B., (1974), J. Bacteriol., 117, 1356–1357.
11. Bendova O., (1986), Folia Microbiol., 31, 422–433.
12. Young T. W., Yagiu M., (1978), Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 44, 59–77.
13. Extremera A. L., Martin I., Montoya E., (1982), Current Genetics, 5, 17–19.
14. Moule A. P., Thomas P. D., (1973), J. Inst. Brew., (London), 79, 137–141.
15. Rogers D., Bevan E. A., (1978), J. Gen. Microbiol., 105, 199–202.
16. Rosini G., (1985), Can. J. Microbiol., 31, 300–302.
17. Golubev W. I., (1990), 14th Int. Spec. Sym. on Yeasts, 36–39.
18. Maraz A., Lakatos L., Pap I., (1990), 14th Int. Spec. Sym. on Yeasts, 58.
19. Sponholz W. R., (1990), 14th Int. Spec. Sym. on Yeasts, 56–57.

20. Vustin M. M., Babjeva I. P., (1990), 14th Int. Spec. Sym. on Yeasts, 68.
21. Blagodatskaya V. M., (1990), 14th Int. Spec. Sym. on Yeasts, 79.
22. Churkina L. G., (1990), 14th Int. Spec. Sym. on Yeasts, 80–81.
23. Bussey H., Vernet T., Sdicu A. N., (1988), *Can. J. Microbiol.*, 34, 38–44.
24. Vondrejs V., Kothera M., Palkova Z., (1988), 14th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology.
25. Wickner R. B., (1976), *Bacteriol. Rev.*, 40, 757–773.
26. Sommer S. S., Wickner R. B., (1982), *Cell*, 31, 429–441.
27. Wickner R. B., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3, 654–661.
28. Bussey H., Sacks W., Galley W., Saville D., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, 2, 346–354.
29. Somers J. M., (1973), *Genetics*, 74, 571–579.
30. Ridley P. S., Wickner R. B., (1983), *J. Virol.*, 45, 800–812.
31. Wickner R. B., (1976), *Genetics*, 82, 273–285.
32. Wickner R. B., Leibowitz M., (1976), *J. Mol. Biol.*, 105, 427–437.
33. Wickner R. B., (1974), *Genetics*, 76, 423–432.
34. Al-Aidroos K., Bussey H., (1978), *Can. J. Microbiol.*, 24, 228–237.
35. Bussey H., Saville D., Hutchins K., Palfree G. E., (1979), *J. Bacteriol.*, 140, 888–892.
36. Hutchins K., Bussey H., (1983), *J. Bacteriol.*, 154, 161–169.
37. Schmitt M., Radler F., (1988), *J. Bacteriol.*, 170, 2192–2196.
38. Skipper N., Bussey H., (1977), *J. Bacteriol.*, 129, 668–677.
39. De la Pena P., Barros F., Gascon S., Ramos S., Lazo P. S., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 96, 544–550.
40. De la Pena P., Barros F., Lazo P. S., Ramos S., (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 10420–10425.
41. Kagan B. L., (1983), *Nature (London)*, 302, 709–711.
42. Bussey H., Sherman D., Somers J. M., (1973), *J. Bacteriol.*, 113, 1193–1197.
43. Kotani H., Shinmyo A., Enatsu T., (1977), *J. Bacteriol.*, 129, 640–650.
44. Cansado J., Longo E., Caló P., Siero C., Velazquez J. B., Villa T. G., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 643–647.
45. Salek A., Schnetter R., Zimmerman U., (1990), *FEMS Microbiol. Letters*, 70, 67–72.
46. Vondrejs V., Palkova Z., Sulo P., (1991), *Biotechnology Current Progress*, Ed. P. N. Cheremisinoff, L. M. Ferrante, 12, 227–249, Technomic Publishing CO.
47. Michalcakova S., Sturdic E., Sulo P., Minarik E., (1990), *Kvasny prum.*, 36, 6–9.
48. Janderova B., Davaasurengijn T., Vondrejs V., Bendova O., (1986), *J. Basic Microbiol.*, 26, 627–631.
49. Vondrejs V., Psenicka I., Kupcova L., Dostalova R., Janderova B., Bendova O., (1983), *Folia Biologica*, 29, 372–384.
50. Vondrejs V., Palkova Z., (1988), 14th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology.

The killer factor in yeasts

Summary

The killer factor is widely spread in yeasts. This phenomenon has been detected in representatives of different genus. The yeasts are immune to their own killer protein. In cooperation with nuclear genes the killer factor is brought about by virus-like particles occurring in yeast cytoplasm. The killer protein is bound to the cell wall receptors of a sensitive strain and then it kills the cell by changing the permeability of the membranes. In addition to the studies on the killer protein properties, its possible utilization is being investigated.

Adres dla korespondencji:

Gotowczyc M., Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, ul. Dąbrowskiego 251, 93–231 Łódź.