

37. OTDK Biológia Szekció

**A leucin- és uracil auxotrófia fiziológiára, továbbá virulenciára
gyakorolt hatásának vizsgálata a *Mucor lusitanicus* vad típusú-,
egyszeres- és kétszeres auxotróf mutáns törzseinek
felhasználásával**

Jánvári Zsófia

Biológia BSc, 3. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Témavezető:

Prof. Dr. Papp Tamás



Szeged

2025

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Irodalmi áttekintés	7
2.1	A járomspórás gombák és a Mucorales rend általános jellemzése	7
2.2	A mucormikózis.....	8
2.3	A leucin bioszintézise és a β -izopropilmalát dehidrogenáz szerepe.....	11
2.4	Az uridin-trifoszfát <i>de novo</i> szintézise és az orotidin-5-monofoszfát dekarboxiláz szerepe.....	12
3.	Célkitűzések.....	14
4.	Anyagok és módszerek.....	15
4.1	A kísérletek során alkalmazott gomba törzsek	15
4.2	Tenyésztési körülmények	15
4.3	Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	15
4.3.1	Élesztő Nitrogén Minimál tápoldat/táptalaj (YNB)	15
4.3.2	Élesztő-glükóz tápoldat/táptalaj (YEG)	16
4.3.3	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) tápoldat (pH 7) 100 mL-re: ..	16
4.3.4	Maláta kivonat táptalaj (MEA)	16
4.3.5	Luria-Bertani táptalaj/tápoldat (LB)	16
4.4	Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek.....	16
4.4.1	DNS gélelektroforézishez használt anyagok	16
4.4.2	Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok.....	16
4.4.3	<i>Galleria mellonella</i> <i>in vivo</i> fertőzéshez használt oldat	17
4.5	Primerek	17
4.6	Vizsgálati módszerek	17
4.6.1	Molekuláris módszerek.....	17
4.6.2	Baktérium és gombasejtek transzformálása.....	19
4.6.3	A gomba törzsek karakterizálása	20
4.6.4	<i>In vivo</i> virulencia vizsgálatok <i>Galleria mellonella</i> <i>in vivo</i> fertőzési modell felhasználásával	21
4.7	Felhasznált bioinformatikai és statisztikai programok	21
5.	Eredmények és kiértékelésük.....	22
5.1	A <i>leuA</i> gén funkcionális változatát tartalmazó pJet+ <i>leuA</i> plazmid konstrukció létrehozása és felszaporítása	22

5.2	Az MS12 törzs leucin auxotrófiájának komplementálása a pJet+ <i>leuA</i> plazmid PEG-mediált úton történő transzformálásával	23
5.3	Általános fenotipikus és fiziológiai jellemzés.....	23
5.3.1	Növekedési képesség vizsgálata különböző tenyésztési hőmérsékleteken	23
5.3.2	Növekedési képesség és élesztő-hifa sejttípus váltás vizsgálata mikroaerofil körülmények között.....	25
5.3.3	Növekedési képesség vizsgálata különböző stressz indukálószerrel jelenlétében	26
5.3.4	Sporulációs képesség vizsgálata	28
5.3.5	Csírázási képesség vizsgálata	29
5.4	<i>In vivo</i> virulencia vizsgálat <i>Galleria mellonella</i> infekciós modell segítségével.	30
6.	Diszkusszió	31
7.	Összefoglalás	34
8.	Köszönet nyilvánítás	37
9.	Irodalomjegyzék.....	38

1. Rövidítések jegyzéke

(NH ₄) ₂ SO ₂	Ammónium-szulfát
Ac-KoA	Acetil-koenzim A
AL	Acetolaktát
AmpR	Ampicillin rezisztencia marker gén
ATC	Aszpartát transzkarbamoiláz
BAT	Elágazóláncú aminosav aminotranszferáz
CaCl ₂	Kalcium-klorid
CP	Karbamoil-foszfát
CPA	Karbamoilaszpartát
CPS-II	Karbamoil-foszfát szintáz II
CTP	Citidin-trifoszfát
CTPS	Citidin-trifoszfát szintáz
DHIV	α,β -dihidroxi-izovalerát
DHO	Dihidro-ototát
DHOD	Dihidro-ototát dehidrogenáz
DHOS	Dihidro-ototáz
Eco47I	Eco47I restrikciós enzim felismerő- és hasítóhely
GC - MS	Gáz kromatográfia – Tömegspektrometria
HPLC - HRMS	Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia - Nagyfelbontású tömegspektrometria
ILV2	Acetohidroxisav-szintáz katalitikus alegység
ILV3	Dihidroxisav-dehidratáz
ILV5	Acetohidroxisav-reduktoizomeráz
ILV6	Acetohidroxisav-szintáz regulátor alegység
IPS	Rovar fiziológiás sóoldat
KCl	Kálium-klorid
KIC	α -ketoizokaproát
KIV	α -ketoizovalerát
KoA	Koenzim A
LB	Luria-Bertani táptalaj/táppoldat
LEU	Leucin
LEU1	Izopropilmalát-izomeráz
LEU2 és LEUA	β -izopropilmalát dehidrogenáz

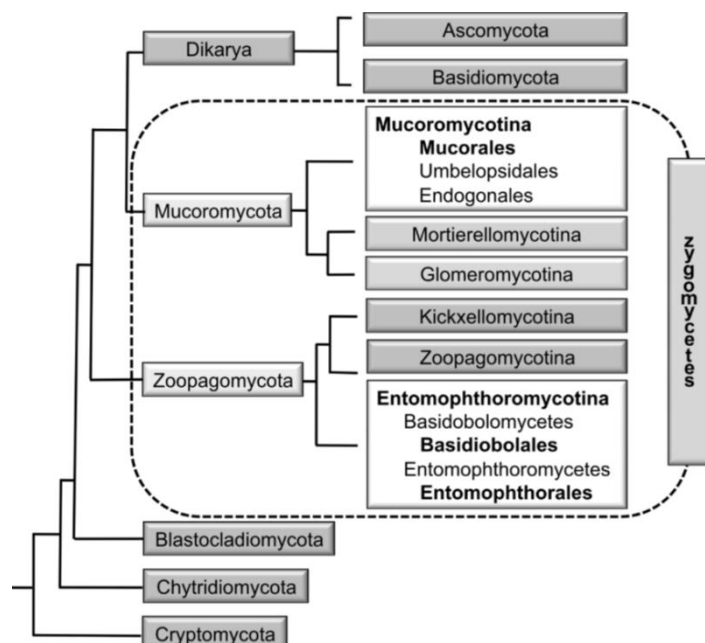
LEU3	Leucin bioszintézis transzkripció faktor
LEU4	2-izopropilmalát szintáz
<i>leuA</i>	<i>Mucor lusitanicus</i> β -izopropilmalát dehidrogenázt kódoló génje
<i>leuAP</i>	<i>leuA</i> gén saját promótere
<i>leuAT</i>	<i>leuA</i> gén saját terminátora
MEA	Maláta kivonat táptalaj
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
Na ₂ EDTA	Dinátrium-etilén-diamin-tetraecetsav
Na ₂ HPO ₄	Dinátrium-hidrogén foszfát
NaCl	Nátrium-klorid
NaH ₂ PO ₄	Nátrium-dihidrogén foszfát
NDP	Nukleozid difoszfát kináz
OMDP	Orotidin-5-monofoszfát dekarboxiláz
OMP	Orotát-monofoszfát
ori	<i>E. coli</i> bakteriális replikációs origó
ORO	Orotát
OTR	Orotát transzriboziláz
PCR	Polimeráz láncreakció
PEG	Polietilén glikol
PMC	PEG – MOPS – Kalcium-klorid puffer
PP	Pirofoszfát
PRPP	Foszforibozil-pirofoszfát
PYR	Piruvát
<i>pyrG</i>	<i>Mucor lusitanicus</i> orotidin-5-monofoszfát dekarboxiláz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute tápoldat
SDS	Nátrium-lauril szulfát
SMC	Sorbitol – MOPS – Kalcium-klorid puffer
TAE	Tris – ecetsav – dinátrium-EDTA puffer
TORC1	Rapamicin célpont komplex 1
Tris-HCl	Tris-hidroklorid
UDK	Uridin-monofoszfát kináz
UDP	Uridin-difoszfát
UMP	Uridin-monofoszfát
UPRT	Uracil foszforibozil-transzferáz

URA	Uracil
UTP	Uridin-trifoszfát
YEG	Élesztő-glükóz tápoldat/táptalaj
YNB	Élesztő Nitrogén Minimál tápoldat/táptalaj
α -IPM	α -izopropilmalát
β -IPM	β -izopropilmalát

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A járomspórás gombák és a Mucorales rend általános jellemzése

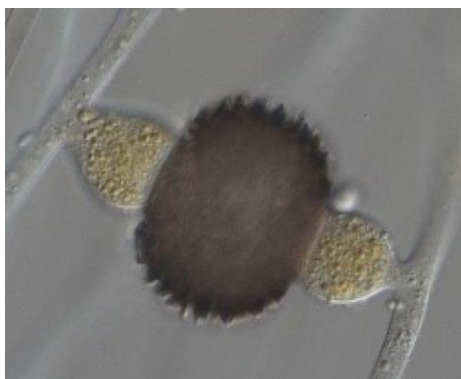
A kutatásunk fókuszában álló *Mucor lusitanicus* faj a Mucorales rend tagja, melyet a Mucoromycota törzsbe sorolnak (Vasudevan és mtsai. 2021, Walther és mtsai. 2019) (1. ábra). A rend tagjainak döntő többsége szaprotróf, azonban találhatóak közöttük olyan termotoleráns fajok is, melyeket opportunistáknak tartanak számunkra. Ezutóbbiak képesek az emberi test hőmérsékletét tolerálni ezáltal képesek gyakran életveszélyes fertőzés kiváltani, főként immunszuppresszált egyéneknél, melyet mucormikózisnak nevezünk (Walther és mtsai. 2019). Ezen fajok jellemzően nagymértékű intrinszik rezisztenciával rendelkeznek a klinikumban alkalmazott terápiás szerek többségével szemben. Ennek köszönhetően a fertőzés kezelése komplikált, így gyakran rendkívül súlyos következményekkel jár (Xisto és mtsai. 2023).



1. ábra: A járomspórás gombák és a Mucorales rend taxonómiai elhelyezkedése (Walther és mtsai. 2019).

Ivartalan szaporodásuk haploid sporangiospórával-, ivaros szaporodásuk, mely két kompatibilis párosodási típusú (+ és -) egyed között zajlik, diploid zigospórával (Hassan és Voigt 2019) (2. ábra) történik. Egyes opportunistáknak humán patogén gombafajok rendelkeznek az alaki dimorfizmus képességével, azaz a környezeti körülmények függvényében képesek fonalas és élesztő formát is felvenni. Ezen tulajdonsággal rendelkező fajok a Mucorales renden belül is megtalálhatóak, melyek esetében a csökkent oxigén tenzió az elsődleges szignál a váltásra. Fonalas növekedésük aplikális megnyúlás útján következik be, míg élesztő formában sarjadzás történik (Wang és Lin, 2012). Azonban a járomspórás gombák ipari szempontból is nagy

jelentőséggel bírnak. Egyes tagjait az élelmiszeriparban sajt- (Morin és mtsai. 2017) és szójatermékek előállítására- (Nout és Aidoo 2010), a feldolgozóiparban ipari enzimek előállítására- (Morin és mtsai. 2017, Benny és mtsai. 2014), valamint a gyógyszerészeti iparban szteroid és terpenoid előanyagok termelésére és biotranszformációjára (Hüttel és Hoffmeister 2010) használják.

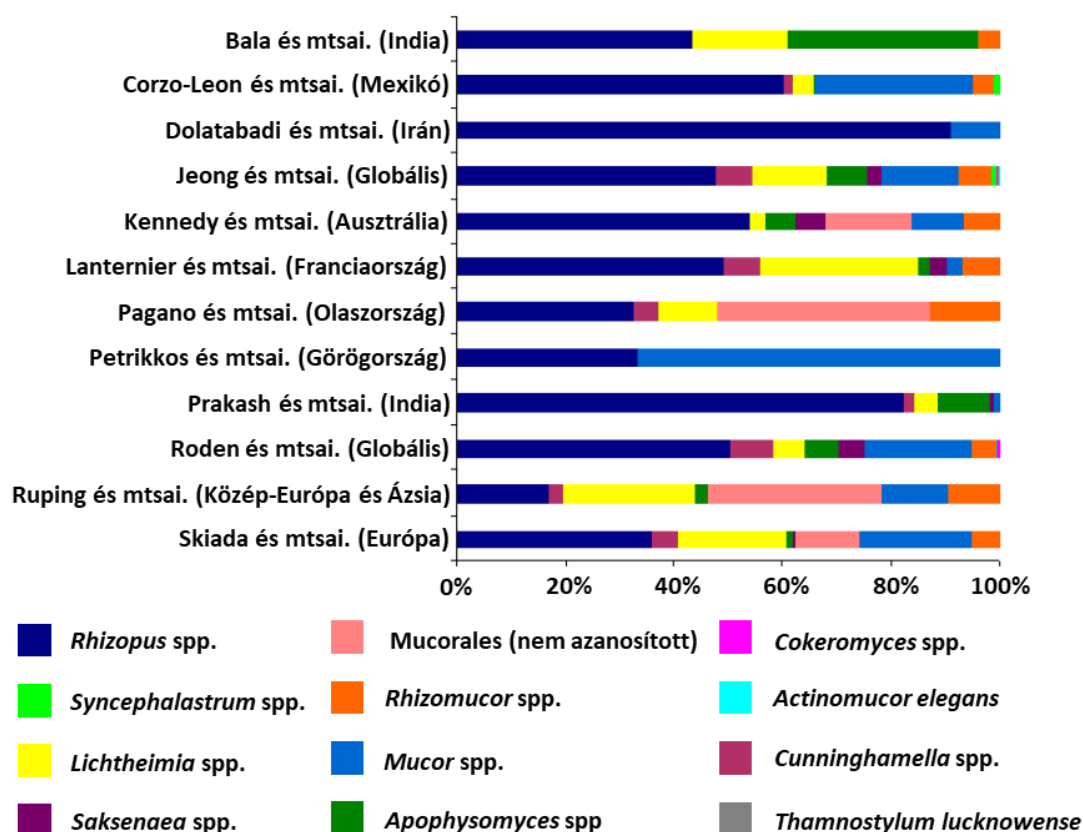


2. ábra: A járomspórás gombák ivaros szaporodása során keletkező diploid zigospóra (Walther és mtsai. 2019).

2.2 A mucormikózis

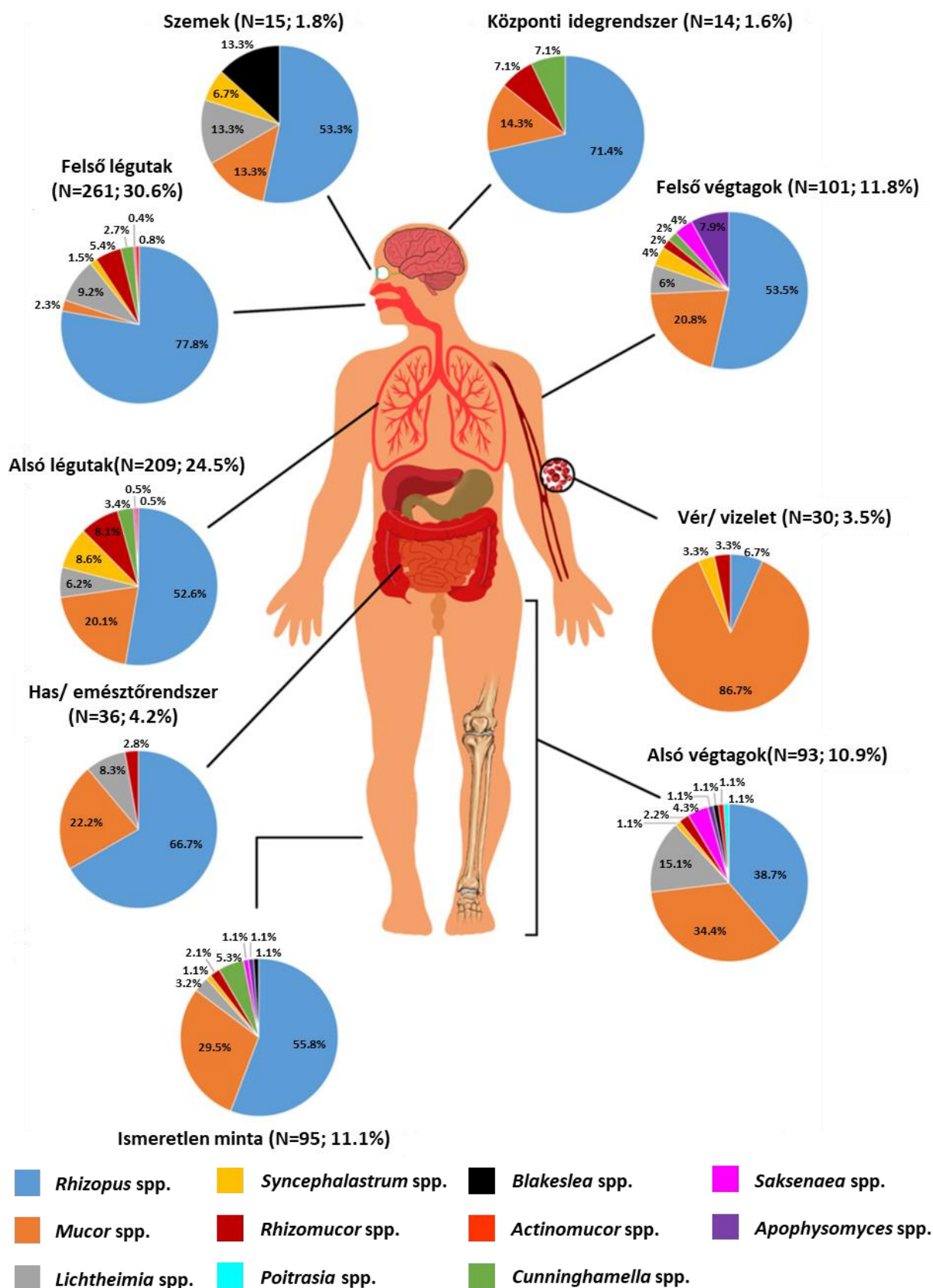
A mucormikózis a Mucorales rend opportunistá humán patogén tagjai által kiváltott, gyakran halálos kimenetelű fertőzés. A mucormikózis elsődleges fertőző ágensei a spórák, melyek leggyakrabban belégzés vagy nagy kiterjedésű sebek útján kerülnek a gazdaszervezetbe. A fertőzés kialakulásának leggyakoribb módja az ivartalan spórák belégzése, mely a fertőzés két leggyakoribb megnyilvánulási formájához, a rhino-orbito-cerebrális és pulmonális fertőzéshez vezet. Leggyakoribb rizikófaktorok az immunszpresszált állapot, diabétesz és annak következményeként kialakuló ketoacidózis állapot, súlyos és hosszantartó neutropénia, rosszindulatú hematológiai elváltozások, valamint a szervátültetés (Asraf és mtsai. 2012, Sahu és mtsai. 2021, Szebenyi és mtsai. 2023). A mucormikózisos fertőzések esetszáma egyre növekvő tendenciát mutat az antifungális szerekkel szembeni rezisztenciának és a rizikófaktorokkal rendelkező egyének növekvő számának köszönhetően (Prakash és Chakrabarti 2021, Garvey és Rowan 2023, Xisto és mtsai 2023) (3. ábra). A fertőzés morbiditási rátája meghaladja az 50%-ot, míg a mortalitási ráta elérheti akár a 95-100%-ot is függően a fertőzés helyétől, a kórokozó fajtól és a beteg egészségügyi állapotától.

A mucormikózist leggyakrabban kiváltó fajok a *Rhizopus* spp., a *Mucor* spp. és a *Lichtheimia* (korábban *Absidia* és *Mycoclados*) spp. nemzetségek tagjai. Más Mucorales nemzetségek, mint a *Rhizomucor*, *Saksenaea*, *Cunninghamella* és *Apophysomyces* által okozott fertőzések kevésbé gyakoriak. (Hassan és Voigt 2019, Prakash és Chakrabarti 2019, Lax és mtsai. 2020, Szebenyi és mtsai. 2023).



3. ábra: A mucormikózist kiváltó fajok gyakoriságának globális eloszlása (Prakash és Chakrabarti 2019).

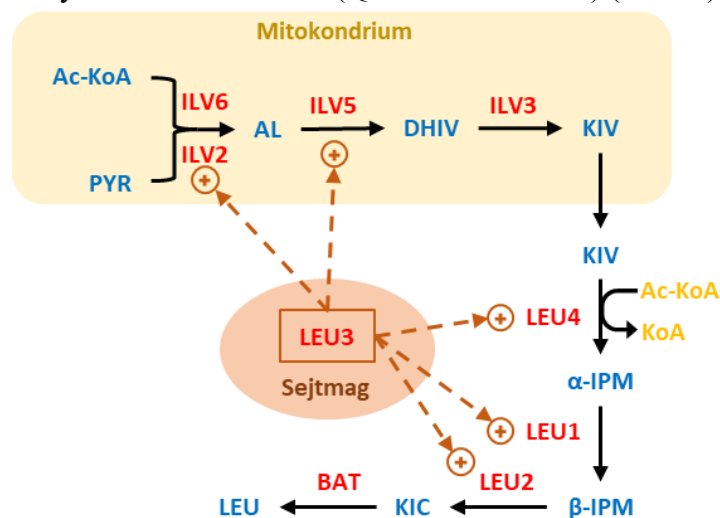
A mucormikózisnak hat fő klinikai megnyilvánulási formája van a fertőzés anatómiai lokalizációját tekintve, melyek gyakoriságuk szerint a következők: **1)** A rhino-orbito-cerebrális mucormikózis, amely az arc- és orrüregeket, valamint az agyat érinti. Tünetei a láz, az arc duzzanata, fekete léziók megjelenése a szájban, illetve az arcon, valamint fejfájást és arcüregelzáródást is kiválthat. **2)** Tüdőt érintő fertőzés esetén pulmonális mucormikózis alakul ki. Ennek tünetei a mellkasi fájdalom, légzési zavar, láz és köhögés. **3)** Kután vagy szubkután mucormikózis esetén a bőrben lokális fertőzés alakul ki, aminek következtében a fertőzött bőrterületen fekélyek vagy hólyagok jelennek meg, továbbá bőrpír és duzzanat is kialakulhat. **4)** A gasztrointesztinális mucormikózis esetén a fertőzés az emésztőszervrendszert érinti, mely leginkább koraszülötteknél fordul elő, felnőtteknél rendkívül ritka. Hányingert, hányást, gyomor-bélrendszeri vérzést és hasi fájdalmakat okoz. **5)** Többféle klinika szövődmény fennállása esetén disszeminált mucormikózis alakulhat ki, mely esetben a szövődmények és a mucormikózis tünetinek megkülönböztetése nehéz. **6)** A kiválasztó szervrendszert érintő fertőzés esetén renális mucormikózis alakul ki, amely vesegyulladásaként jelentkezhet (Hassan és Voigt 2019, Badali és mtsai. 2021) (4. ábra).



4. ábra: Fertőzött páciensek szervezetének különböző területeiből izolált mucormikózist kiváltó Mucorales fajok 2015 és 2020 között az Egyesült Államokban. N: minta elemszám (Badali és mtsai. 2021).

2.3 A leucin bioszintézise és a β -izopropilmalát dehidrogenáz szerepe

A leucin egy elágazóláncú esszenciális aminosav, mely hatással van a glükóztoleranciára és a lipidanyagcserére (Zhang és mtsai. 2020). Bioszintézise a mitokondriumban kezdődik és a citoplazmában fejeződik be. Ennek első lépésében, a mitokondriumban, acetyl-koenzim A-ból (Ac-KoA) és piruvátból (PYR) acetolaktát (AL) keletkezik, melyet az acetohidroxisav-szintáz katalitikus- (ILV2) és regulátor (ILV6) alegysége katalizál. Ezt követően α,β -dihidroxi-izovalerát (DHIV) képződik az acetohidroxisav-reduktoizomeráznak (ILV5) köszönhetően. A harmadik lépésben α -ketoizovalerát (KIV) keletkezik, köszönhetően a dihidroxisav-dehidratáz (ILV3) aktivitásának. A keletkezett α -ketoizovalerát a citoplazmába kerülve α -izopropilmaláttá (α -IPM) alakul egy Ac-KoA felhasználásával, melyet a β -izopropilmalát szintáz (LEU4) katalizál. Ezt követően β -izopropilmalát (β -IPM) keletkezik, mely lépést az izopropilmalát-izomeráz (LEU1) katalizál. A β -izopropilmalát dehidrogenáz (LEU2) aktivitásának köszönhetően α -ketoizokaproát (KIC) jön létre. Az utolsó lépésben történő transzaminálásnak köszönhetően leucin (LEU) keletkezik, melyet az elágazóláncú aminosav aminotranszferáz (BAT) katalizál. A bioszintézis szabályozása a leucin bioszintézis transzkripciós faktor (LEU3) által történik, mely a sejtmagban képes aktiválni az *ilv2*, *ilv5*, *leu4*, *leu1* és *leu2* kifejeződését, ezáltal pozitívan szabályozva a bioszintézist (Que és mtsai. 2020) (5. ábra).



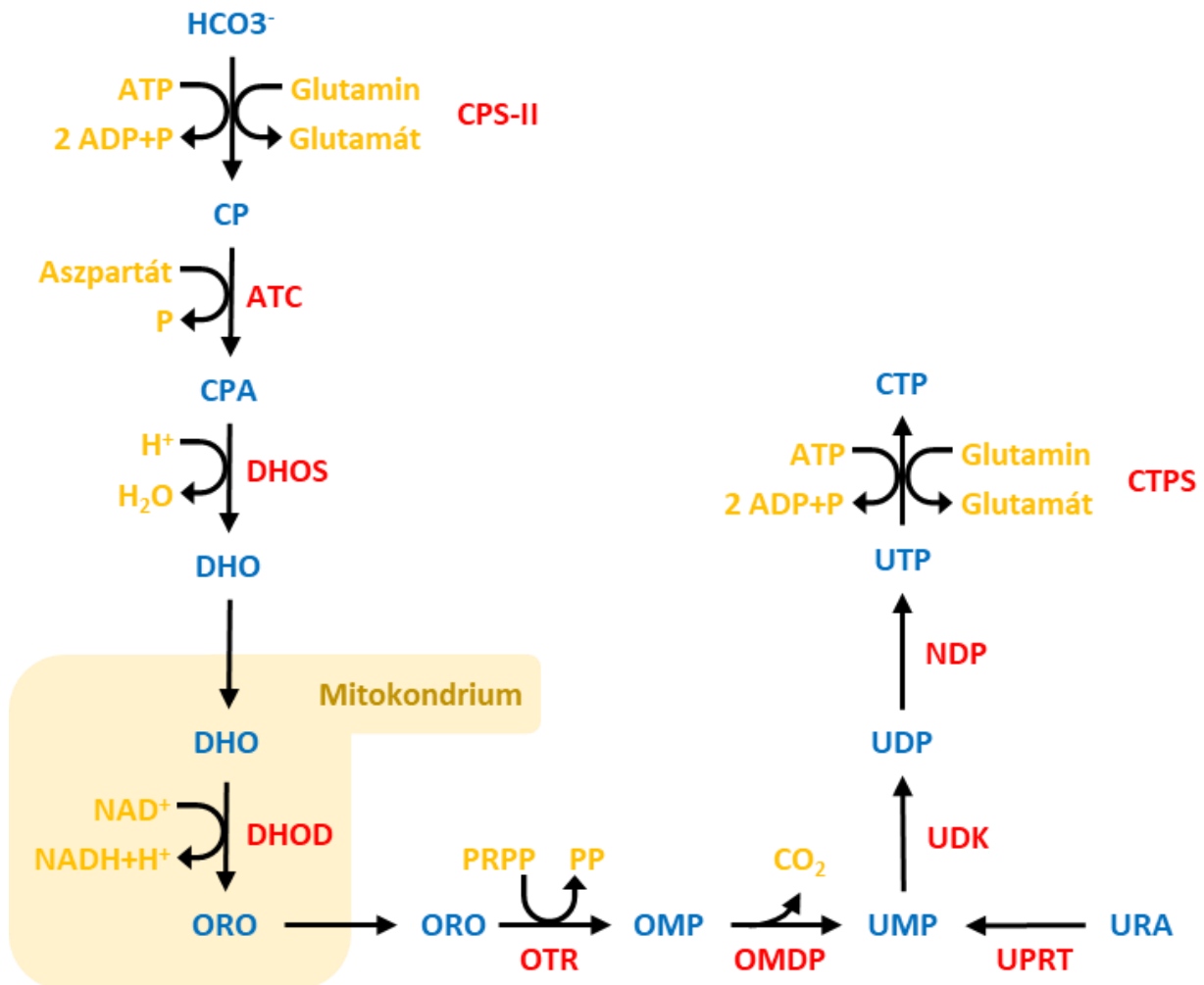
5. ábra: A leucin bioszintézisének útvonala, illetve annak pozitív szabályozása. Ac-KoA: acetyl-koenzim A; KoA: koenzim A; PYR: piruvát; ILV2: acetohidroxisav-szintáz katalitikus alegység; ILV6: acetohidroxisav-szintáz regulátor alegység; AL: acetolaktát; ILV5: acetohidroxisav-reduktoizomeráz; DHIV: α,β -dihidroxi-izovalerát; ILV3: dihidroxisav-dehidratáz; KIV: α -ketoizovalerát; α -IPM: α -izopropilmalát; LEU4: 2-izopropilmalát szintáz; β -IPM: β -izopropilmalát; LEU1: izopropilmalát-izomeráz; KIC: α -ketoizokaproát; LEU2: β -izopropilmalát dehidrogenáz; LEU: leucin; BAT: elágazóláncú aminosav aminotranszferáz; LEU3: leucin bioszintézis transzkripciós faktor (Que és mtsai. 2020).

A leucin bioszintézise nélkülözhetetlen a normál fehérje homeosztázis fenntartásához, befolyásolja a glükóztoleranciát, a lipidanyagcserét, a morfogenezist és a virulenciát (Que és mtsai. 2020). *M. lusitanicus* esetében a β -izopropilmalát dehidrogenázt (LEU2) (CBS277.49v3.0 adatbázis fehérje azonosító: 1508136; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci3/Mucci3.home.html>) a *leuA* gén kódolja.

2.4 Az uridin-trifoszfát *de novo* szintézise és az orotidin-5-monofoszfát dekarboxiláz szerepe

Az uridin-trifoszfát egy pirimidinvázis nukleotid, melynek *de novo* szintézise a citoplazmában és a mitokondriumban zajlik. Első lépése a citoplazmában a bikarbonát ion (HCO_3^-) karbamoil-foszfáttá (CP) történő alakítása glutamin és ATP felhasználásával, melyet a karbamoil-foszfát szintáz II (CPS-II) katalizál. Ezt követően karbamoilaspartát (CPA) keletkezik az aszpartát transzkarbamoiláz (ATC) aktivitásának köszönhetően egy aszpartát felhasználásával. A harmadik lépésben dihidro-rotát (DHO) keletkezik, melyet a dihidro-rotáz (DHOS) katalizál. A mitokondriumban a dihidro-rotát dehidrogenáz (DHOD) általi katalízisnek köszönhetően orotát (ORO) keletkezik egy NAD^+ molekula redukciójával párhuzamosan. Ezt követően ebből a citoplazmában orotát-monofoszfát (OMP) keletkezik az orotát transzriboziláznak (OTR) köszönhetően. Az OMP dekarboxilációja által uridin-monofoszfát (UMP) keletkezik, melyet az orotidin-5-monofoszfát dekarboxiláz (OMPD) katalizál. Ennek az uridin-monofoszfát kináz (UDK) általi foszforilációja által uridin-difoszfát (UDP), majd ennek nukleozid difoszfát kináz (NDP) általi foszforilációjával uridin-trifoszfát (UTP) keletkezik. A keletkezett UTP felhasználódhat RNS szintézisre vagy citidin-trifoszfát (CTP) szintézisre, mely utóbbit a CTP szintáz (CTPS) katalizál, illetve ez majd DNS szintézisre használódhat fel. Abban az esetben, ha a bioszintézis útvonal sérült az UMP keletkezését megelőző lépés(ek)ben, akkor a környezetből felvett uracil (URA) egy lépésben UMP-tá alakítható egy foszforibozilációs reakció során, melyet az uracil foszforibozil-transzferáz (UPRT) katalizál, így menekíthető az uridin-trifoszfát *de novo* szintézis útvonala (Ljungdahl és Daignan-Fornier 2011, Moffatt és Ashihara 2002) (6. ábra). Az uridin-trifoszfát esszenciális a transzkripció, a DNS replikáció, a transláció (Moffatt és Ashihara 2002, Ljungdahl és Daignan-Fornier 2011), a szignáltranszdukció (Sigoillot és mtsai. 2007) szempontjából és befolyásoló hatással van a sejtosztódásra, a sejtek energia metabolismusára, a foszfolipid bioszintézisre (Löffler és Zameitat 2013), valamint a stressz válaszokra (Pan és mtsai. 2019). *M. lusitanicus* esetében az orotidin-5-monofoszfát dekarboxilázt (OMDP) (CBS277.49v3.0

<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci3/Mucci3.home.html>) a *pyrG* gén kódolja.



6. ábra: A uridin-trifoszfát *de novo* szintézisének útvonala, illetve az uracil bekapcsolódása az útvonalba. CP: karbamoil-foszfát; CPS-II: karbamoil-foszfát szintáz II; CPA: karbamoilaszpártát; ATC: aszpartát transzkarbamoiláz; DHO: dihidro-otótát; DHOS: dihidro-otótát; ORO: otótát; DHOD: dihidro-otótát dehidrogenáz; OMP: otótát-monofoszfát; OTR: otótát transzriboziláz; PRPP: foszforibozil-pirofoszfát; PP: pirofoszfát; OMDP: ototidin-5-monofoszfát dekarboxiláz; UMP: uridin-monofoszfát; UDK: uridin-monofoszfát kináz; UDP: uridin-difoszfát; NDP: nukleozid difoszfát kináz; UTP: uridin-trifoszfát; CTP: citidin-trifoszfát; CTPS: CTP szintáz; URA: uracil; UPRT: uracil foszforibozil-transzferáz (Moffatt és Ashihara 2002, Ljungdahl és Daignan-Fornier 2011).

3. Célkitűzések

A virulencia faktorok és patomechanizmusok feltárásához elengedhetetlen a megfelelő markerek, illetve kontroll törzsek használata az ezekre irányuló kutatásokban. Fontos a megfelelő szelekciós markerek kiválasztása, melyek nem befolyásolják szignifikánsan az általunk vizsgálni kívánt folyamatokat, jelenségeket. Annak fényében, hogy a mucormikózisos fertőzések nagyrészeért a Mucorales rendbe tartozó fajok felelősek, valamint a *M. lusitanicus* széleskörben alkalmazott modellorganizmus számos területen (virulencia faktorok azonosítása, patomechanizmus feltárása, antifungális szerekekkel szembeni rezisztencia hátterének vizsgálata, járomspórás gombák genetikai analízise és módosítása, differenciális génexpresszió vizsgálata a morfogenezis során, ipari enzimek és másodlagos metabolitok termelés stb.), így munkánk célja a leucin és uracil auxotrófia fiziológiát, továbbá virulenciát befolyásoló hatásának vizsgálata a *M. lusitanicus* vad típusú-, egyszeresen- és kétszeresen auxotróf törzseinek felhasználásával.

Mindezek alapján kutatásunk céljaként a következő konkrét célokat tűzzük ki:

3.1 A *leuA* gén funkcionális változatát tartalmazó expressziós vektor konstrukció létrehozása, majd transzformálása egy leucin és uracil kétszeresen auxotróf mutáns törzsbe

Célunk egy olyan shuttle-vektor konstrukció létrehozása, mely tartalmazza a *M. lusitanicus leuA* génjének funkcionális változatát, illetve fenttartható és felszaporítható *DH5α Escherichia coli* baktériumsejtekben, valamint ennek PEG-mediált transzformációval történő bejutattása egy leucin és uracil kétszeresen auxotróf mutáns törzsbe, ezáltal komplementálva a leucin auxotrófiát, így egy uracil egyszeresen auxotróf törzset létrehozva.

3.2 A *M. lusitanicus* vad típusú-, leucin és uracil egyszeresen-, valamint kétszeresen auxotróf törzseinek fiziológiai vizsgálata

Célunk a leucin és uracil egyszeresen-, valamint kétszeresen auxotrófia fiziológiát befolyásoló hatásának vizsgálata. Vizsgálataink magukba foglalják a növekedési ráta különböző hőmérsékleteken (20-, 25-, 30- és 35 °C) történő-, a mikroaerofil növekedési képesség-, az élesztő-hifa sejttypus váltási képesség-, a stressz adaptációs képesség-, a csírázási- és sporulációs képesség vizsgálatát.

3.3 *In vivo* virulencia vizsgálata *Galleria mellonella* infekciós modell segítségével

Célunk a leucin és uracil egyszeresen-, valamint kétszeresen auxotrófia virulenciát befolyásoló hatásának vizsgálata.

4. Anyagok és módszerek

4.1 A kísérletek során alkalmazott gomba törzsek

A kísérletekhez a *Mucor lusitanicus* CBS 277.49 azonosítójú vad típusú izolátumot, ennek *leuA*⁻ és *pyrG*⁻ kétszeresen auxotróf mutáns MS12 törzsét, ezutóbbi *pyrG*⁺ komplementált és *leuA*⁻ egyszeresen auxotróf mutáns MS12+*pyrG* törzsét, valamint a jelen dolgozatban prezentált és általunk létrehozott *leuA*⁺ komplementált és *pyrG*⁻ egyszeresen auxotróf mutáns MS12+*leuA* (melyben a leucin auxotrófiát a *leuA* gén funkcionális változatának kifejeztetésével komplementáltuk) törzsét alkalmaztuk. A fiziológiai jellemzéshez és az *in vivo* virulencia vizsgálatokhoz az MS12 és törzset is használtuk kontrollként.

4.2 Tenyésztési körülmények

A fent említett törzseket YNB táptalajon, kiegészítve uracillal és/vagy leucinnal, kéthavi átoltással, 4 °C-on tartottuk fent. A növekedési ráta vizsgálata YNB táptalajon történt 4 napon keresztül, az alkalmazott tenyésztési hőmérsékletek 20-, 25-, 30- és 35 °C voltak. A mikroaerofil növekedési- és sejttípus-váltási vizsgálatokat BBL GasPak Anaerobic System (Beckton Dickinson) segítségével végeztük el 25 °C-on 4 napig tenyésztve, előbbi esetben YNB táptalajon, utóbbi esetében YNB tápoldatban. A csírázási képesség vizsgálatához 4 napon keresztül 25 °C-on MEA táptalajon tenyésztett törzsekről származó spórákat használtunk, majd a vizsgálat során RPMI 1640 tápoldatban tenyésztettük azokat 25 °C-on 8 órán keresztül folyamatos rázatás (180 rpm) mellett. Az *in vivo* virulencia vizsgálatokhoz felhasznált spórák 7 napig 25 °C-on MEA táptalajon tenyésztett törzsekről származtak. A sporulációs képesség vizsgálatához a törzseket 7 napig tenyésztettük 25 °C-on MEA táptalajon. A törzseket a fenti esetekben állandó megvilágítás mellett tenyésztettük.

4.3 Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

A kutatómunkánk során felhasznált vegyületek a VWR Chemicals gyártótól származtak, amely esetben más gyártótól származtak, ott a gyártót külön feltüntettük.

4.3.1 Élesztő Nitrogén Minimál tápoldat/táptalaj (YNB)

1 m/V% D-glükóz, 0,15 m/V% (NH₄)₂SO₄, 0,15 m/V% Na-L-glutamát, 0,05 m/V% YNB (Difco), illetve 0,05 m/V% uracil és/vagy leucin (pH 4,5). Szilárd táptalaj esetén 2 % agart adtunk a tápoldathoz. PEG-mediált protoplaszt transzformációs kísérlet során a protoplasztokat 0,8 M szorbitolt és 1 m/V% agart tartalmazó YNB fedőagarral keverve (pH 3,2) öntöttük 0,8 M szorbitollal kiegészített, 2 m/V% agart tartalmazó YNB táptalajra.

4.3.2 Élesztő-glükóz tápoldat/táptalaj (YEG)

1 m/V% D-glükóz, 0,5 m/V% élesztőkivonat, szilárd táptalaj esetén 2 m/V% agart adtunk a tápoldathoz.

4.3.3 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) tápoldat (pH 7) 100 mL-re:

1,04 m/V% RPMI (Apollo Scientific); 3,453 m/V% 3-N-morfolin-propánszulfonsav (MOPS); 1 m/V% 30 mg/mL L-glutamin. Szükség esetén 0,05 m/V% leucinnal és/vagy uracillal kiegészítve.

4.3.4 Maláta kivonat táptalaj (MEA)

1 m/V% D-glükóz, 2,5 m/V% élesztő kivonat, 1 m/V% maláta kivonat, 2 m/V% agar.

4.3.5 Luria-Bertani táptalaj/tápoldat (LB)

1 m/V% pepton, 1 m/V% NaCl, 0,5 m/V% élesztő kivonat, 50 µg/mL ampicillin (BioChemica). Szilárd táptalaj esetén 2 m/V% agart adtunk a tápoldathoz. A hosszútávú tárolás érdekében a *leuA* célgén pJet1.2 (Thermo Scientific) plazmidba klónoztuk, majd DH5α *Escherichia coli* (Zymo Reserach - Mix & Go! Competent Cells - DH5 Alpha) sejtekbe transzformáltuk. A transzformáns sejtek szelektálásának érdekében a sejteket 50 µg/mL ampicillinnel (BioChemica) kiegészített LB táptalajon tenyésztettük a gyártó utasításainak megfelelően.

4.4 Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek

Az alábbi oldatok esetében oldószerként steril desztillált vizet használtunk, amely esetben más oldószert alkalmaztunk, ott azt feltüntettük.

4.4.1 DNS gélelektroforézishez használt anyagok

TAE (Tris – ecetsav – dinátrium-EDTA) puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6); 1 mM Na₂EDTA
Agaróz gél: 0,8 m/V% agaróz TAE-pufferben oldva

Etidium-bromid törzsoldat (Sigma): 10 mg/mL desztillált vízben oldva

Mintapuffer: 6x DNS mintapuffer (Thermo Scientific)

Molekulasúly marker: 1 kb DNS marker (Thermo Scientific): steril desztillált víz –
molekulasúly marker – 6x DNS mintapuffer 4:1:1 arányú keveréke

4.4.2 Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok

Protoplasztáló oldat: 100 mM nátrium-foszfát puffer, 0,8 M szorbitol, 1,5 m/V% csigaenzim

Nátrium-foszfát puffer (100 mM): 25 mM Na₂HPO₄, 75 mM NaH₂PO₄

SMC puffer: 50 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, 0,8 M szorbitol

PMC puffer: 40m/V% PEG 4000, 10 mM MOPS, 0,6 M szorbitol, 50 mM CaCl₂

4.4.3 *Galleria mellonella* in vivo fertőzéshez használt oldat

Rovar fiziológiás sóoldat (IPS): 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM EDTA és 30 mM nátrium-citrát 100 mM Tris-hidroklorid-ban (Tris-HCl) (pH 6.9).

4.5 Primerek

A *M. lusitanicus* CBS 277.49 törzs *leuA* (CBS277.49v3.0 adatbázis fehérje azonosító: 1508136; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci3/Mucci3.home.html>) génjének felszaporításához szükséges oligonukleotid indítószekvenciákat a PerlPrimer v1.1.21 számítógépes program segítségével terveztük meg (Marshall 2004), az MS12+*leuA* komplementált transzformáns törzsek ellenőrzéséhez a gyártó által, a pJet 1.2 klónozó vektor kit-hez (Thermo Scientific) mellékelt szekvenáló primereket alkalmaztuk. Az általunk felhasznált indítószekvenciák az 1. Táblázatban találhatóak összesítve.

1. Táblázat: A *M. lusitanicus* CBS 277.49 vad típusú törzs *leuA* génjének felszaporításához, illetve az MS12+*leuA* leucin auxotrófia komplementált törzs ellenőrzéséhez használt indítószekvenciák.

Primer	5'-3'	Termékek	A termék mérete (bp)
<u>a <i>leuA</i> gén felszaporításához használt indítószekvenciák</u>			
MleuA1	ACTGCAGGATGGGACAAGGTATATAT	<i>leuA</i> gén saját	4390
MleuA2	TGCAGGATGGGACAAGGTATATAT	promóter és terminátor régijával	
<u>a transzformánsok ellenőrzéséhez használt indítószekvenciák</u>			
pJet1.2 forward primer	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	pJet 1.2 klónozó vektor szekvenáló primerek	4449
pJet1.2 reverz primer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG		

4.6 Vizsgálati módszerek

4.6.1 Molekuláris módszerek

4.6.1.1 DNS tisztítás

A genomi DNS tisztítás 4 napos tenyésztést követően történt, melyhez a ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrepTM (Zymo Research) kit-et használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően.

4.6.1.2 DNS gélelektroforézis

A DNS mintákhoz 10 μL mintapuffert adtunk, majd a várt fragmentumok elválasztása 0.8 m/V% agaróz gélben, 80-110 V feszültséggel, 1 órán keresztül történt. Mind az agaróz gél készítéséhez, mind futtatópuffernek TAE puffert használtunk, továbbá a gél 0.5 $\mu\text{g/mL}$ etídium-bromidot tartalmazott. A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb DNS létra (Thermo Scientific) molekulásúly markert használtunk.

4.6.1.3 Plazmid visszaizolálása agaróz gélből

A visszaizolálni kívánt DNS fragmentumokat tartalmazó gélrészletet szikével UV lámpa alatt vágtuk ki a 0.8 m/V% agarózt tartalmazó gélből. A Zymoclean Large fragment DNA Recovery Kit (ZymoResearch) segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

4.6.1.4 Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények

Kísérleteink során a PCR reakciókat ProFlex™ 3 x 32-well PCR System (Thermo Fischer Scientific) készülékben végeztük. A genomi DNS-ből és össz DNS-ből történő amplifikálásához 2X Phusion High Fidelity DNA Polymerase Master mix (Thermo Scientific) kit-et használtunk, a gyártó utasításainak megfelelően. A reakciókat 20 μL -es végső térfogatban készítettük el a következőképpen:

- genomi/ össz DNS (10-100 ng) - 0,8 μL
- specifikus primerek (1. Táblázat) (10 μM) - 0,8 μL
- 2X Phusion High Fidelity DNA Polymerase Master mix (Thermo Scientific) - 10 μL
- molekuláris víz (RNáz, DNáz mentes, steril) (Lonza) - 7,6 μL

A *leuA* gén és pJet+*leuA* plazmid felszaporításának körölményei:

- | | | | |
|---------|--------|---------------------|-------------|
| • 98 °C | 10 sec | elődenaturálás | 1 ciklus |
| • 98 °C | 1 sec | denaturálás | } 30 ciklus |
| • 63 °C | 5 sec | primerkötődés | |
| • 72 °C | 1 min | láncszintézis | |
| • 72 °C | 1 min | végső láncszintézis | 1 ciklus |

4.6.1.5 Plazmid konstrukció létrehozása

A *leuA* a β -izopropilmalát dehidrogenázt kódoló és a leucin auxotrófiát komplementáló gén (Roncero és mtsai. 1989). A *leuA* expressziójához azt pJet 1.2 plazmidba (Thermo Scientific) klónoztunk, majd a vektor konstrukciót *DH5 α* *E. coli* sejtekbe (Zymo Reserach - Mix & Go! Competent Cells - DH5 Alpha) transzformáltuk a konstrukciók hosszú távú tárolása érdekében. A plazmid konstrukció létrehozásának első lépéseként felszaporítottuk a *M.*

lusitanicus CBS 277.49 törzs *leuA* génjét a fentebb részletezett módon (4.6.1.4 bekezdés) az 1. Táblázatban felsorolt indítószekvenciák segítségével. Mivel a gyártó (Thermo Scientific) tompavégű linearizált formában forgalmazza a pJet 1.2 plazmidot, így az ampikon plazmidba klónozása tompavégű ligálással történt T4 DNS ligáz (New England BioLabs Inc.) enzim segítségével, annak előzetes restrikciós emésztése és tisztítása nélkül. A *leuA* gén funkcionális változatát tartalmazó plazmid *in vivo* felszaporítása szintén *DH5α E. coli* sejtek segítségével történt a gyártó utasításainak megfelelően.

4.6.2 Baktérium és gombasejtek transzformálása

4.6.2.1 Plazmid konstrukció *DH5α E. coli* kompetens baktériumsejtekbe transzformálása

A *DH5α E. coli* sejteket (50 µL) jégen történő kiolvasztást követően 20 µL ligátumot adtunk a kompetens sejtekhez, majd 5 perc jégen történő inkubálást követően a sejteket 37 °C-ra előmelegített LB táptalajra szélesztettük, melyet 100 µg/mL ampicillinnel (BioChemica) egészítettünk ki. A szélesztést követően a csészéket 37 °C-on, 16 órán át inkubáltuk a telepek megjelenéséig. A plazmid konstrukció izolálása a Zyppy™ Plazmid Miniprep kit-tel (Zymo Research) történt a gyártó utasításainak megfelelően. A kinyert plazmid konstrukciót -20 °C-on tároltuk felhasználásig.

4.6.2.2 Protoplasztképzés

A *M. lusitanicus* MS12 törzsének protoplaszt képzéséhez a sejtek előtenyésztését 25 °C-on celofánon végeztük el 16 órán keresztül. Ehhez az MS12 törzset MEA táptalajon, 4 napon keresztül, 25 °C-on megvilágítás mellett tenyésztettük, majd steril desztillált vízzel lemostuk a képződött sporangiospórákat és a tömény spórasuszpenzióból oltótűvel friss, steril celofánkoronggal fedett YEG táptalajra oltottunk le. A tenyészeteket 25 °C-on, 16 órán keresztül neveltük, majd a keletkezett micéliumkorongokat 30 mL protoplasztáló oldatba helyezve 3 órán át, szobahőmérsékleten, folyamatos rázatás (50 rpm) mellett elősegítettük a protoplasztok képződését és leválását. A sejtfal bontásához saját készítésű, éticsiga (*Helix pomatia*) gyomorból preparált lítikus emésztőenzimet használtunk. A micéliumkorongok SMC pufferes mosását követően, tölcsérbe helyezett gézen keresztül sterilen átszűrtük a protoplasztokat a micélimtörmeléktől való elkülönítés érdekében. Centrifugálással (3000 rpm, 10 perc, 4 °C) összegyűjtöttük a protoplasztokat, majd 5 mL SMC pufferrel mostuk azokat, egy újabb centrifugálást követően pedig 250 µL SMC pufferbe vettük fel ($\sim 1 \cdot 10^5$ protoplaszt) azokat.

4.6.2.3 PEG-mediált protoplaszt transzformáció

Az általunk alkalmazott PEG-mediált transzformációs módszer a van Heeswijck és Roncero (1984) által leírt módszer módosítása (van Heeswijck és Roncero 1984). A 250 µL

SMC pufferben felvett protoplasztokhoz 5-10 µg plazmidot és 20 µL PMC puffert adtunk, a protoplasztok és a plazmid összezapásával elősegítve a transzformáció hatékonyságát. Ezt követően a mintákat 30 percen keresztül jégen inkubáltuk. További 2,5 mL PMC puffer hozzáadása után a mintákat 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd centrifugáltuk. A kiüledett sejteket kis mennyiségű (100-200 µL) SMC-ben szuszpendáltuk és 0.8 M szorbitollal kiegészített YNB fedőagarral összekeverve szintén 0.8 M szorbitolt tartalmazó YNB csészékre szélesztettük. Az MS12+*leuA* mutánsokat a *leuA* szelekciós markerre szelektáltuk, így a táptalajokat csak uracillal egészítettük ki. Ezt követően a csészéket 4-10 napig, a transzformáns telepek megjelenéséig szobahőmérsékleten inkubáltuk fénytől elzárva.

4.6.3 A gomba törzsek karakterizálása

4.6.3.1 Általános fenotipikus és fiziológiás jellemzés

A növekedési ráta vizsgálata során a fentebb felsorolt (4.1 bekezdés) törzseket 4 napig minimál, valamint leucinnal és/vagy uracillal kiegészített YNB táptalajon tenyésztettük aerob és mikroaerofil körülmények mellett is, melyekhez 10^4 spórát oltottunk le. Az aerob körülményekre vonatkozó növekedési ráta vizsgálatát elvégeztük 20-, 25-, 30- és 35 °C-on is. A mikroaerofil növekedési ráta vizsgálatát csak 25 °C-on végeztük el. Az élesztő-hifa sejttypus-váltás vizsgálatához a törzseket 4 napig minimál, valamint leucinnal és/vagy uracillal kiegészített YNB tápoldatban tenyésztettük mikroaerofil körülmények mellett, melynél a végső spórakoncentrációt 10^6 spóra/ mL-re állítottuk be. A mikroaerofil növekedési ráta- és sejttypus-váltás vizsgálatát BBL GasPak Anaerobic System (Beckton Dickinson) segítségével végeztük el. A stressz adaptációs vizsgálatok során különböző stressz indukálószerkeket alkalmaztunk eltérő típusú stressz indukálásához, melyek a következők: sejtfa stressz kiváltásához kongó vörös és kalkofluór fehér festékeket-, sejtmembrán stressz kiváltásához Na-lauril-szulfátot (SDS), ozmotikus stressz kiváltásához NaCl-t (0,4- és 1 M koncentrációkban) és megemelt D-glükóz koncentrációt (5 m/V%) alkalmaztunk. Ehhez 10^4 spórát oltottunk le és a törzseket 4 napig tenyésztettük 25 °C-on fénytől elzárva (a kongóvörös és a kalkofluór fehér festékek fényérzékenysége miatt) a különböző stressz indukálószerkeket tartalmazó YNB táptalajokon, melyeket szükség szerint kiegészítettünk leucinnal és/vagy uracillal. A csírázási képesség vizsgálatához a sporangiospórákat steril desztillált vizes mosást követően minimum 16 órán keresztül inkubáltuk 4 °C-on a spórák szinkronizálásának érdekében, majd vizsgáltuk a spórák csírázását RPMI 1640 tápoldatban 25 °C-on folyamatos rázatás (180 rpm) mellett 8 órán keresztül, melynél a végső spórakoncentrációt 10^6 spóra/ mL-re állítottuk be. A vizsgálat során a leoltástól számítva különböző inkubációs idők elteltével mintát vettünk és mikroszkópos

vizsgálat segítségével megállapítottuk a csírázó spórák arányát %-ban, mely mintavételi időpontok a következők: 3-, 3,5-, 4-, 4,5-, 5-, 6-, 7- és 8 óra. A sporulációs képesség vizsgálatához 10^4 spórát oltottunk le MEA táptalajra, majd 7 napig tenyésztettük azokat 25 °C-on, végül a 7. napon a lemosást követően meghatároztuk a törzsek által létrehozott spórák számát. A különböző hőmérsékleteken-, illetve stresszindukálószeres jelenlétében történő növekedés iképesség vizsgálatokat követően a hifák mikromorfológiájának vizsgálatához Leica DFC295 digitális mikroszkóp kamerával (Leica Microsystems) felszerelt Leica DMI4000B automata inverz fénymikroszkópot- (Leica Microsystems), valamint a felvételek elkészítéséhez a LAS V szoftvert (Leica Microsystems) használtuk. Az élesztő-hifa sejttípus váltási-, sporulációs- és csírázási képesség vizsgálatához Zeiss AxioCam ERc5s digitális mikroszkóp kamerával (Carl Zeiss) kamerával felszerelt Zeiss AxioLab RE fénymikroszkópot- (Carl Zeiss), illetve a ZEN 2011 (Carl Zeiss) szoftvert használtunk.

4.6.4 *In vivo* virulencia vizsgálatok *Galleria mellonella* *in vivo* fertőzési modell felhasználásával

A fertőzést 12-16 órával megelőzően (0.18-0.35 g tömegű) nagy viaszmolyle (Galleria mellonella) lárvákat (Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék) 28 °C-on, sötétben inkubáltuk a kísérlet kivitelezéséig. A lárvák fertőzésének megkezdése előtt azok hasi oldalát etanollal sterilizáltuk, majd az utolsó lábkezdemenyen keresztül fertőztük azokat 20 µL IPS-ben szuszpendált 10^6 spórával U-100 ((29G) x 12,7 mm) steril inzulinos tű segítségével (BD Micro-Fine™). Törzsenként 20 lárvát fertőztünk, melyhez kontrollként 20-20 µl IPS oldattal injektált lárvát használtunk. A fertőzést követően a lárvákat 28 °C-on, sötétben tartottuk, és túlélésüket napi rendszerességgel ellenőriztük a fertőzést követő 7 napon keresztül.

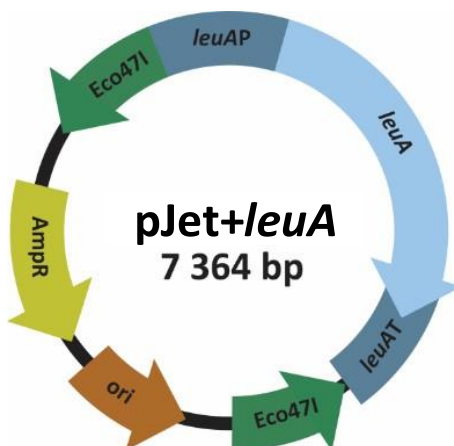
4.7 Felhasznált bioinformatikai és statisztikai programok

A PCR reakciókhoz használt specifikus indítószekvenciákat a PerlPrimer v 1.1.21 (Marshall 2004) szoftver segítségével terveztük meg. A kísérletek statisztikai analízise a GraphPad Prism v 9.0 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) szoftverrel, parametrikus t-teszt és Log-rank (Mantel-Cox) teszt használatával történt. Statisztikailag szignifikáns eltérést abban az esetben állapítottunk meg parametrikus t-tesztnél, ha $P \leq 0,05$ volt, míg Log-rank (Mantel Cox) teszt esetében akkor állapítottunk meg szignifikáns eltérést, ha $P \leq 0,0332$ volt. A kapott szignifikáns eltéréseket minden esetben jelöltük és feltüntettük a hozzájuk tartozó szignifikancia intervallum értékeket is, illetve a jelölések színkódolása megegyezik az egyes törzsekhez tartozó ábrázolt eredmények színkódolásával.

5. Eredmények és kiértékelésük

5.1 A *leuA* gén funkcionális változatát tartalmazó pJet+*leuA* plazmid konstrukció létrehozása és felszaporítása

A *leuA* gén funkcionális változatának expressziójához pJet 1.2 (Thermo Scientific) alapú cirkuláris vektor konstrukciót terveztünk (7. ábra). A *leuA* gén felszaporításához szükséges indítószekvenciákat PerlPrimer v 1.1.21 (Marshall 2004) szoftver segítségével terveztük meg a MycoCosm CBS277.49v3.0 (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci3/Mucci3.home.html>) genom adatbázisban található β -izopropilmalát dehidrogenáz fehérjét (fehérje azonosító: 1508136) kódoló gén szekvenciája alapján. A gén felszaporításához 4 napig tenyésztett vad típusú CBS 277.49 törzsből kivont genomi DNS-t használtunk, majd a génre specifikus primerek (1. Táblázat) felhasználásával PCR reakció segítségével felszaporítottuk azt. A PCR terméket 0.8 m/V%-os agaróz gélen futtattuk, majd UV-lámpa felett kivágtuk a megfelelő sávot (4390 bp) és visszaizoláltuk azt. Ezt követően ennek klónozása linearizált pJet 1.2 expressziós vektorba (Thermo Scientific) tompavégű ligálással történt T4 DNS ligáz (New England BioLabs Inc.) enzim segítségével.

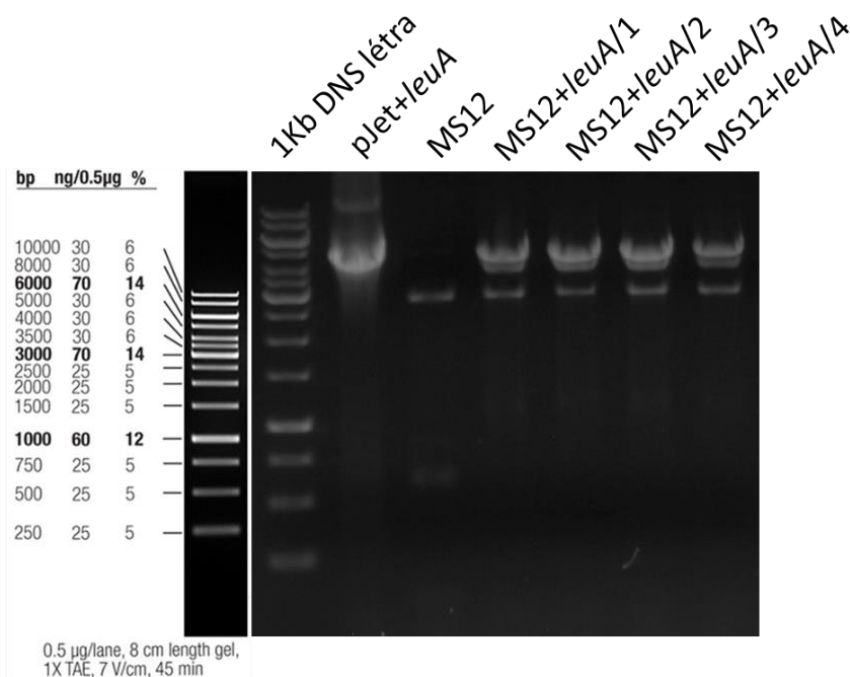


7 ábra: A *leuA* gén funkcionális változatát tartalmazó pJet+*leuA* shuttle-vektor konstrukció felépítése. *ori*: *E. coli* bakteriális replikációs origó. *Eco47I*: *Eco47I* restrikciós enzim felismerő- és hasítóhely; *AmpR*: ampicillin rezisztencia marker gén; *leuAP*: *leuA* gén saját promótere; *leuA*: *leuA* gén; *leuAT*: *leuA* gén saját terminátora.

A ligálást követően *DH5a E. coli* sejtekbe (Zymo Reserach - Mix & Go! Competent Cells - DH5 Alpha) transzformáltunk-, majd a transzformánsok segítségével felszaporítottuk a plazmidot és visszaizoláltuk azt. A visszaizolált plazmidok ellenőrzését 0.8 m/V%-os agaróz gélen történő futtatással kivitelezük.

5.2 Az MS12 törzs leucin auxotrófiájának komplementálása a pJet+*leuA* plazmid PEG-mediált úton történő transzformálásával

Munkánk során a *M. lusitanicus* MS12 (*leuA*⁻ és *pyrG*⁻) protoplasztjait transzformáltuk az általunk létrehozott pJet+*leuA* plazmiddal, mely tartalmazza a *leuA* gén funkcionális változatát annak saját promóter- és terminátor szekvenciájával együtt. A sikeres transzformációt követően több, mint 40 egyedi telepet izoláltunk, amelyek ellenőrzése a DNS kivonást követő, plazmid specifikus primerek (1. Táblázat) felhasználásával történő PCR reakcióval és agaróz gélelektroforézissel valósult meg. Kontrollként az MS12 törzset, valamint a transzformációhoz használt plazmidot is alkalmaztuk. A plazmid felvétele esetében 4449 bp méretű termékeket tudtunk felszaporítani a PCR reakció segítségével (8. ábra).



8. ábra: Az MS12+*leuA* transzformánsok ellenőrzése PCR reakcióval a pJet+*leuA* plazmid specifikus primerek felhasználásával. DNS létraként 1 kb DNA ladder-t használtunk (Thermo Scientific).

További kísérleteinkben az MS12+*leuA*/4 számú izolátumot használtuk fel, melyre a későbbiekben MS12+*leuA* törzsként hivatkozunk.

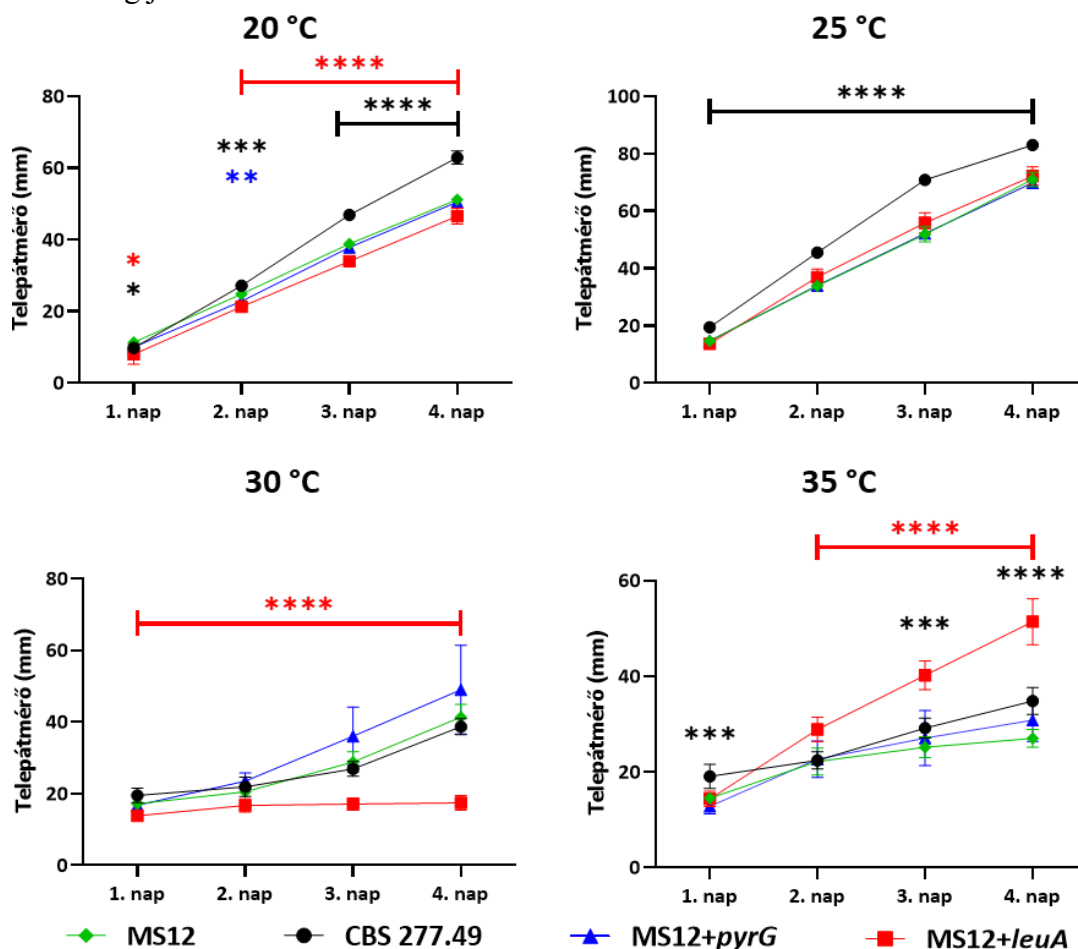
5.3 Általános fenotipikus és fiziológiai jellemzés

Kontrollként minden esetben az MS12 törzset használtuk, illetve a feltüntetett szignifikáns eltéréseket is az MS12 törzshöz viszonyítva állapítottuk meg.

5.3.1 Növekedési képesség vizsgálata különböző tenyésztési hőmérsékleteken

Elsőként a törzsek (CBS 277.49, MS12, MS12+*pyrG*, MS12+*leuA*) különböző tenyésztési hőmérsékletekhez való adaptációs képességét vizsgáltuk. Ennek érdekében a

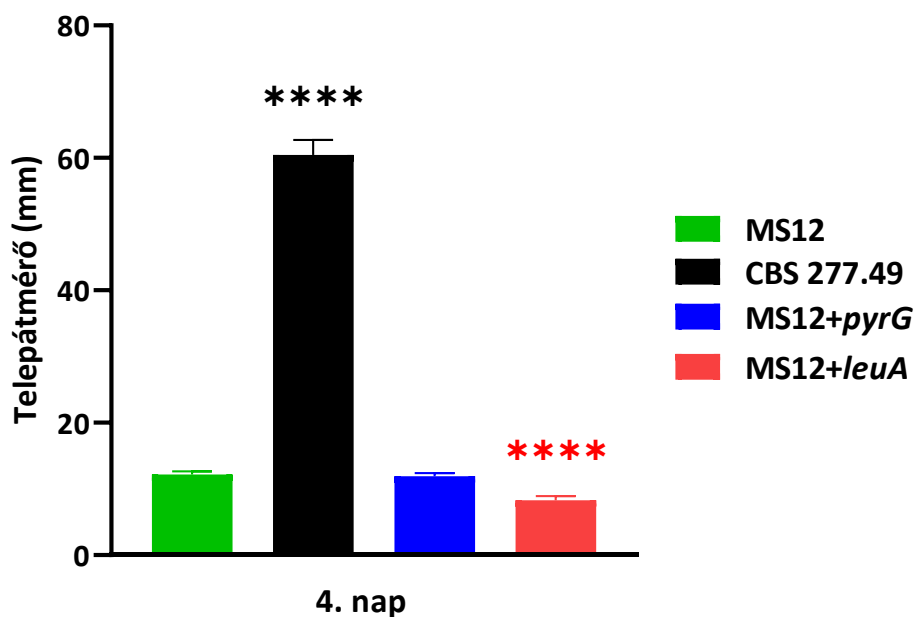
törzseket 20-, 25-, 30- és 35 °C-on tenyésztettük 4 napig. A 20 °C-on történő tenyésztés esetén szignifikánsan csökkent növekedést tapasztaltunk az MS12+*leuA* törzsnél a teljes tenyésztési időszak alatt, az MS12+*pyrG* törzs esetében csak a 2. napon, míg a CBS 277.49 törzsnél csak az 1. napon, illetve ezutóbbi törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott a tenyésztési időszak fennmaradó részében. A 25 °C-on történő tenyésztés esetén a CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott. 30 °C esetében az MS12+*leuA* törzs növekedése szignifikánsan elmaradt a kontrollhoz viszonyítva a teljes tenyésztési időszak alatt. Ezzel szemben a 35 °C-on történő tenyésztés esetében az MS12+*leuA* törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott a tenyésztési időszak 2. napjával kezdődően, továbbá a CBS 277.49 törzs is szignifikánsan erősebb növekedést mutatott (9.ábra). A hifák mikromorfológiájában nem figyeltünk meg jelentős eltéréseket.



9. ábra: A *Mucor lusitanicus* vad típusú, uracil- és leucin egyszeres, valamint kétszeres auxotróf mutáns törzseinek telepátmérői különböző tenyésztési hőmérsékleteken. Az MS12 törzshöz viszonyított párosítatlan t-próba alapján szignifikáns eltéréseket csillagokkal jelöltük, melyek a következőképpen feleltethetők meg: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$. A csillagok színei az egyes törzseket jelölik, melyek megegyeznek a jelmagyarázat színeivel.

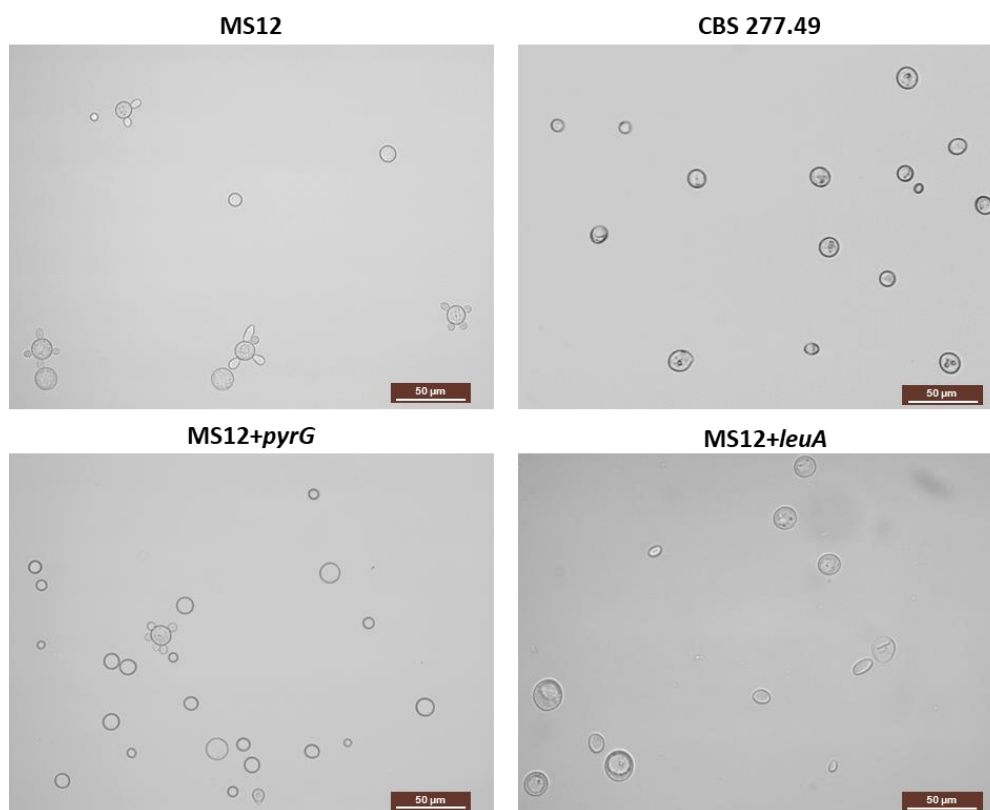
5.3.2 Növekedési képesség és élesztő-hifa sejttípus váltás vizsgálata mikroaerofil körülmények között

A mikroaerofil körülményekhez való alkalmazkodási képesség vizsgálata fontos, hiszen a fertőzés kialakulása és progressziója során is oxigén szegény körülményekhez kell adaptálnia a patogénnek. Ennek vizsgálatához a törzseket 25 °C-on tenyésztettük 4 napig mikroaerofil körülmények között. A CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb-, míg az MS12+*leuA* törzs szignifikánsan gyengébb növekedést mutatott (10. ábra). A hifák mikromorfológiájában nem figyeltünk meg jelentős eltéréseket.



10. ábra: A *Mucor lusitanicus* vad típusú, uracil- és leucin egyszeres, valamint kétszeres auxotróf mutáns törzseinek telepátmérői mikroaerofil körülmények között 25 °C-on. Az MS12 törzshöz viszonyított párosítatlan t-próba alapján szignifikáns eltéréseket csillagokkal jelöltük, melyek a következőképpen feleltethetők meg: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$. A csillagok színei az egyes törzseket jelölik, melyek megegyeznek a jelmagyarázat színeivel.

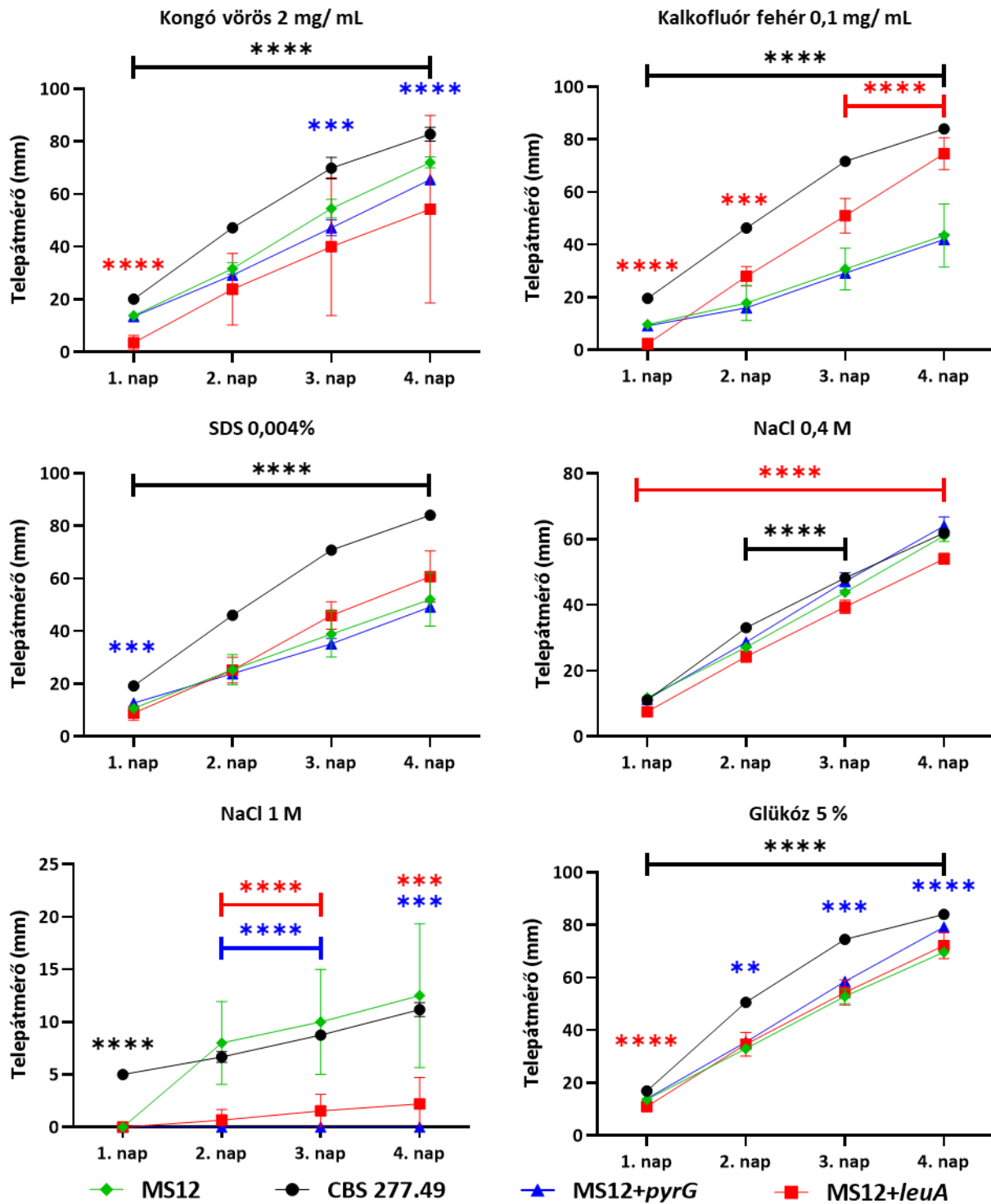
Az élesztő-hifa sejttípus váltás szempontjából fontos szignál a csökkent oxigén tenzió. Ennek vizsgálata érdekében a törzseket tápoldatba leoltva 25 °C-on 4 napig mikroaerofil körülmények között tenyésztettük. Egyik törzs esetében sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, mindegyik törzsnél élesztőszerű sejtek figyelhetők meg. Hifás- vagy pseudo-hifás növekedést mutató sejteket egyetlen esetben sem figyeltünk meg (11. ábra).



11. ábra: A *Mucor lusitanicus* vad típusú, uracil- és leucin egyszeres, valamint kétszeres auxotróf mutáns törzseinek élesztő-hifa sejttípus váltási képességének vizsgálata mikroaerofil körülmények között. Skála: 50µm.

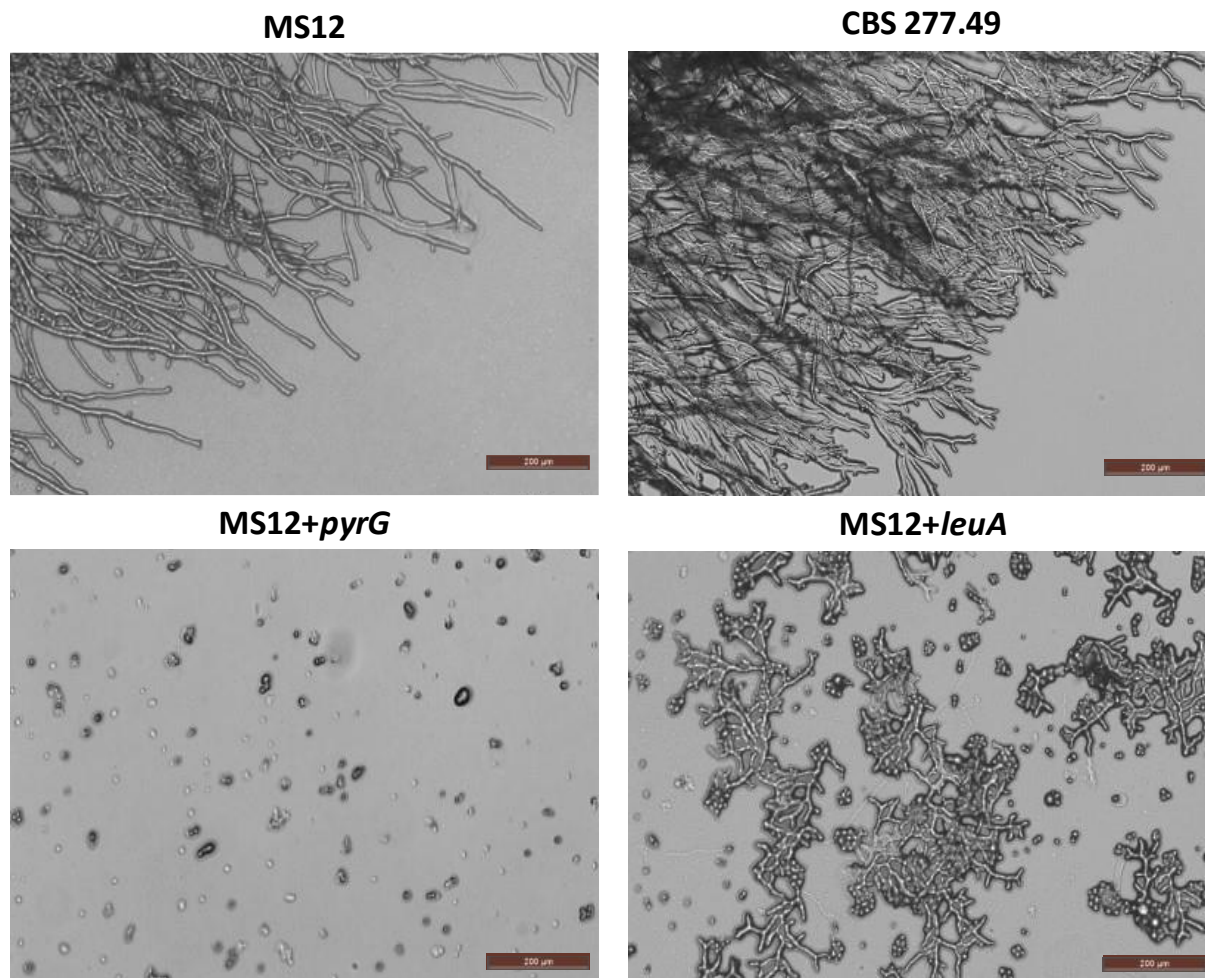
5.3.3 Növekedési képesség vizsgálata különböző stressz indukálószerke jelenlétében

A stressz indukálószerke és -körülmények jelenlétéhez való alkalmazkodási képesség vizsgálata érdekében a törzseket különböző stressz indukálószerke jelenlétében tenyésztettük 25 °C-on tenyésztettük 4 napig. Kongó vörös jelenlétében az MS12+*pyrG* és MS12+*leuA* törzs szignifikánsan gyengébb-, míg a CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott. Kalkofluór fehér jelenlétében az MS12+*leuA* törzs a tenyésztési időszak 1. napján szignifikánsan gyengébb-, míg a tenyésztési időszak fennmaradó részében szignifikánsan erősebb növekedést mutatott, valamint a CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott. SDS jelenlétében az MS12+*pyrG* törzs szignifikánsan gyengébb-, míg a CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott. 0,4 M NaCl jelenlétében az MS12+*leuA* törzs szignifikánsan gyengébb-, míg a CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott. 1 M NaCl jelenlétében az MS12+*pyrG* és MS12+*leuA* törzs szignifikánsan gyengébb-, míg a CBS 277.49 törzs a tenyésztési időszak 1. napján szignifikánsan erősebb növekedést mutatott. 5 % glükóz jelenlétében az MS12+*leuA* törzs szignifikánsan gyengébb növekedést mutatott a tenyésztési időszak 1. napján, míg az MS12+*pyrG* és CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott. (12. ábra)



12. ábra: A *Mucor lusitanicus* vad típusú, uracil- és leucin egyszeres, valamint kétszeres auxotróf mutáns törzseinek telepátmérői különböző stressz indukálószerke jelenlétében. Az MS12 törzshöz viszonyított párosítatlan t-próba alapján szignifikáns eltéréseket csillagokkal jelöltük, melyek a következőképpen feleltethetők meg: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$. A csillagok színei az egyes törzseket jelölik, melyek megegyeznek a jelmagyarázat színeivel.

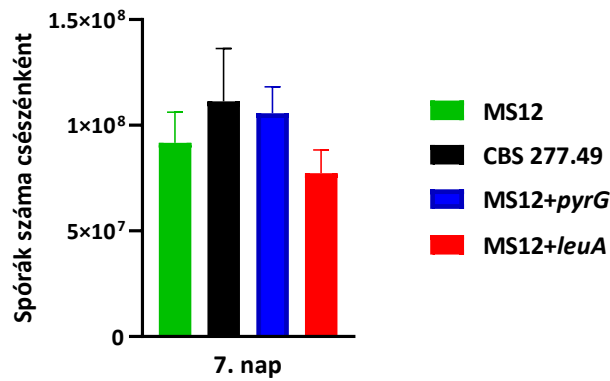
A hifák mikromorfológiájában egyedül az 1 M-os NaCl koncentráció esetében figyeltünk meg jelentős eltérést. Az MS12+*pyrG* törzs spóráinak csírázása jelentős mértékben gátolt, szinte alig figyelhető meg csírázásnak indult spóra. Az MS12+*leuA* törzs spórái csekély mértékben voltak képesek csírázni (13. ábra).



13. ábra: A *Mucor lusitanicus* vad típusú, uracil- és leucin egyszeres, valamint kétszeres auxotróf mutáns törzsei által 1 M NaCl koncentráció mellett létrehozott hifáinak mikromorfológiai vizsgálata. Skála: 200µm.

5.3.4 Sporulációs képesség vizsgálata

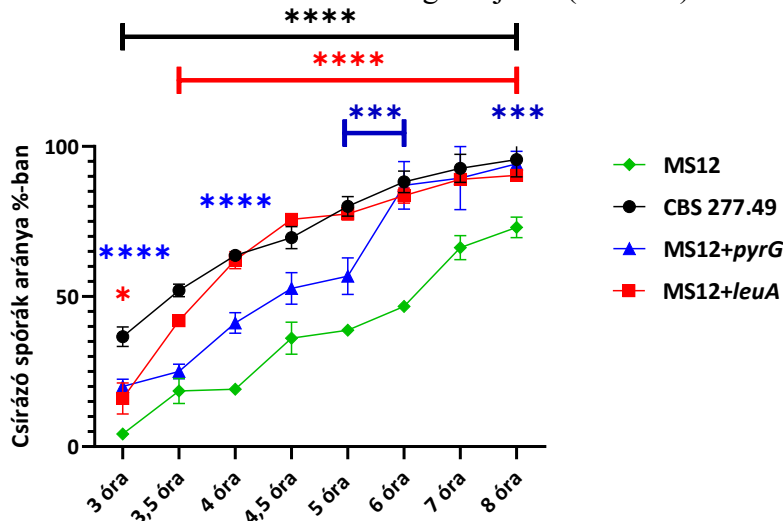
A sporulációs képesség vizsgálatához a törzseket 25 °C-on tenyésztettük 7 napig MEA táptalajon. Szignifikáns eltérést egyik törzs esetében sem tapasztaltunk (14. ábra).



14. ábra: A *Mucor lusitanicus* vad típusú, uracil- és leucin egyszeres, valamint kétszeres auxotróf mutáns törzsei által létrehozott spórák száma csészénként.

5.3.5 Csírázási képesség vizsgálata

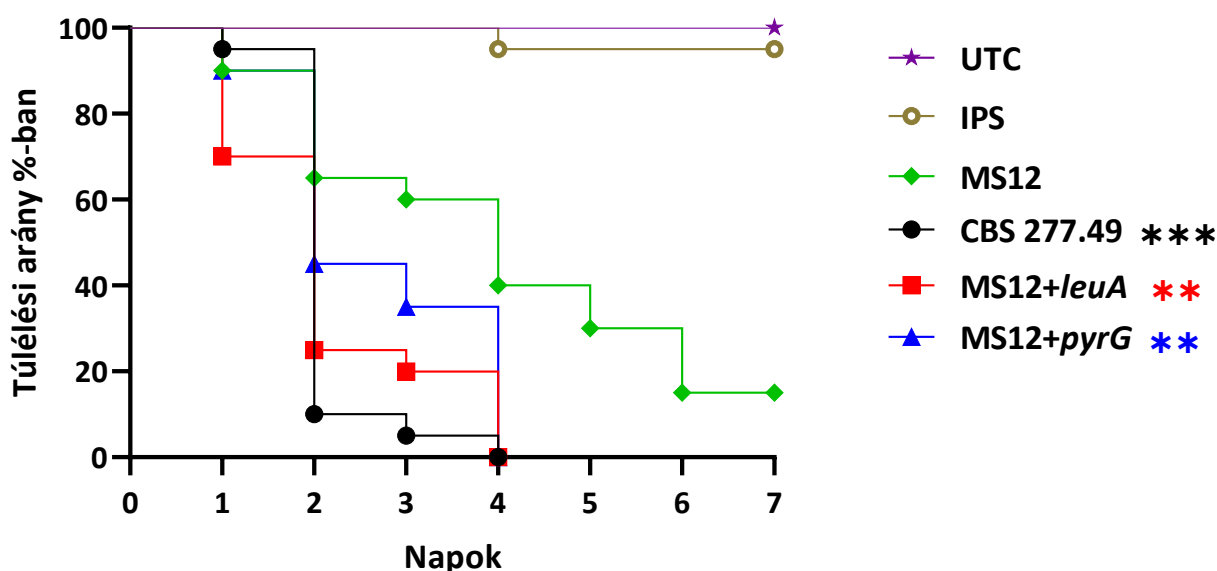
A csírázási képesség vizsgálatához a törzsek spóráit 4 °C-on 16 órán keresztül előinkubáltuk a spórák szinkronizációja érdekében. A csírázási képesség vizsgálatát 25 °C-on végeztük 180 rpm-en történő folyamatos rázatás mellett RPMI 1640 tápoldatban 8 órán keresztül. Mind az MS12+pyrG, az MS12+leuA és a CBS 277.49 törzs esetében is szignifikánsan megnövekedett csírázási arányt figyeltünk meg. Mindhárom törzs esetében korábban indul meg a csírázás a kontroll MS12 törzshöz viszonyítva, illetve a vizsgálati időszak végére a spórák jelentősen nagyobb része már csírázásnak indult. Ezenfelül fontos kiemelni, hogy az MS12+leuA törzs csírázási görbéje a 4. órával kezdődően meglehetősen nagy hasonlóságot mutat a CBS 277.49 törzs csírázási görbéjével (15. ábra).



15. ábra: A *Mucor lusitanicus* vad típusú, uracil- és leucin egyszeres, valamint kétszeres auxotróf mutáns törzseinek csírázási képesség vizsgálata. Az MS12 törzshöz viszonyított párosítatlan t-próba alapján szignifikáns eltéréseket csillagokkal jelöltük, melyek a következőképpen feleltethetők meg: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$. A csillagok színei az egyes törzseket jelölik, melyek megegyeznek a jelmagyarázat színeivel.

5.4 *In vivo* virulencia vizsgálat *Galleria mellonella* infekciós modell segítségével

Az *in vivo* virulencia vizsgálatok kivitelezéséhez nagy viasmoly (*G. mellonella*) lárva *in vivo* gerinctelen fertőzési modellt alkalmaztunk. Kísérleteink során érintetlen- és spóramentes IPS kezelt kontrollt is alkalmaztunk, valamint a fertőzéstől számított 7 napon keresztül monitoroztuk a lárvákat. Az IPS kezelt kontroll csoport esetében a lárvák közül 1 pusztult el a kísérlet befejezéséig. A szignifikáns eltérések meghatározásához kontrollként az MS12 törzset használtuk. Az MS12 törzs esetében a túlélési arány 15 % volt a 7. napon, míg az MS12+*pyrG*, az MS12+*leuA* és CBS 277.49 törzs esetében a 4. napra az összes lárva elpusztult. A CBS 277.49 törzs esetében a lárvák 85 %-a elpusztult az 1. és 2. nap között. Szintén nagy mértékű (45 %) halálozás figyelhető meg az 1. és 2. nap között az MS12+*pyrG* és MS12+*leuA* törzs esetében is. Eredményeink azt mutatják, hogy az MS12+*pyrG* és az MS12+*leuA* törzs virulenciája szignifikánsan megnövekedett az auxotrófia komplementálásának következtében, illetve hasonló CBS 277.49 törzs patogenitásához (16. ábra).



16. ábra: *Mucor lusitanicus* vad típusú, uracil- és leucin egyszeres, valamint kétszeres auxotróf mutáns törzsek patogenitásának vizsgálata *Galleria mellonella* *in vivo* infekciós modellben. A szignifikancia számítását Log-rank (Mantel-Cox) teszttel végeztük, az MS12 törzshöz viszonyítva, melyek a következőképpen feleltethetők meg: * $P \leq 0.0332$; ** $P \leq 0.0021$; *** $P \leq 0.0002$; **** $P \leq 0.0001$. UTC: érintetlen kontroll. Spóramentes kezelt kontrollként IPS-t alkalmaztunk.

6. Diskusszió

A leucin egy elágazóláncú esszenciális aminosav, mely elengedhetetlen a normál fehérje homeosztázis fenntartásához (Que és mtsai. 2020), valamint hatással van a glükóztoleranciára és a lipidanyagcserére (Zhang és mtsai. 2020). A β -izopropilmalát dehidrogenáz (LEUA) a β -izopropilmalát (β -IPM) α -ketoizokaproáttá (KIC) történő átalakítását katalizálja. A munkánk során létrehozott és felhasznált MS12+*leuA* törzsben a *leuA* gén funkcionális változatának pJet1.2 plazmidon történő PEG-mediált transzformáció általi bejuttatása útján komplementáltuk a szülői uracil- és leucin kétszeresen auxotróf MS12 törzs leucin auxotrófiáját.

Az uridin-trifoszfát egy pirimidinvázis nukleotid, melynek *de novo* szintézise nélkülözhetetlen a transzkripció, a DNS replikáció, a transzláció (Moffatt és Ashihara 2002, Ljungdahl és Daignan-Fornier 2011), a szignáltranszdukció (Sigoillot és mtsai. 2007) szempontjából és befolyásoló hatással van a sejtosztódásra, a sejtek energia háztartására, a foszfolipid bioszintézisre (Löffler és Zameitat 2013), valamint a stressz válaszokra (Pan és mtsai. 2019). A munkánk során felhasznált MS12+*pyrG* törzsben, melyet kutatócsoportunk már korábban létrehozott, a *pyrG* gén funkcionális változatának bejuttatásával történt a fentebb említett módon az uracil auxotrófia komplementálása.

25 °C-on tenyésztve az uracil- és leucin egyszeres auxotróf törzseket, nem tapasztaltunk jelentős különbséget a növekedési képességükben. *Magnaporthe oryzae* (Que és mtsai. 2020) növénypatogén gomba, és az ipari jelentőséggel bíró *Hansenula polymorpha* (Xiuping és mtsai. 2017) metilotróf élesztőgomba esetében úgy találták, hogy a leucin és az uracil auxotrófia által okozott szignifikáns fenotipikus eltérések megfelelő mértékben menekíthetőek ezen vegyületek tápközegbe való hozzáadásával kontroll körülmények között.

A kontroll hőmérséklethez (25 °C) viszonyított alacsonyabb (20 °C), illetve magasabb hőmérsékleteken (30- és 35 °C), az uracil egyszeresen auxotróf MS12+*leuA* törzsnél tapasztalt szignifikáns különbségek szoros összefüggésben állhatnak az auxotrófia foszfolipid bioszintézisre (Löffler és Zameitat 2013), valamint a stressz válaszokra (Pan és mtsai. 2019) gyakorolt befolyásoló hatásával. Az alacsonyabb hőmérséklethez való adaptálódás során a sejtmembrán rigidebbé válik és megnő a telített oldalláncú zsírsavak mennyiségével együtt az ergoszterin mennyisége is. Ezzel szemben a megnövekedett hőmérséklethez való adaptálódás során a sejtmembránszerkezet lazábbá válik és megnő a telítetlen oldalláncú zsírsavak mennyisége is, amellyel párhuzamosan csökken az ergoszterin mennyisége, hogy lehetővé tegye a lazább sejtfalszerkezet kialakulását (López-Malo és mtsai. 2013, Johnston és mtsai. 2020, Godinho és mtsai. 2021, Regan és mtsai. 2022). Mindezek alapján az MS12+*leuA* törzs

megnövekedett hőmérsékleten (35 °C) való tenyésztése esetén a törzs erősebb növekedésre lehet képes, figyelembe véve a leucin auxotrófia lipid anyagcserét befolyásoló hatását (Zhang és mtsai. 2020).

A mikroaerofil körülmények között nagymértékű transzkriptomikai változások mennek végbe (Homa és mtsai. 2022), mely körülmény mellett az MS12+*leuA* törzs szignifikánsan gyengébb növekedést mutatott. Ez szoros összefüggésben állhat az uracil auxotrófia transzkripciót, DNS replikációt, transzlációt (Moffatt és Ashihara 2002, Ljungdahl és Daignan-Fornier 2011) és szignáltranszdukciót (Sigoillot és mtsai. 2007) befolyásoló hatásával.

Az MS12+*pyrG* törzs esetében szignifikánsan gyengébb növekedést tapasztaltunk kongó vörös jelenlétében, mely egy vízdékony azofesték, ezenfelül képes kötődni a sejtfal β -1,3-glukán komponenséhez, ezáltal sejtfal stresszt előidézve. Kalkofluór fehér jelenlétében, mely egy, a gombák sejtfalában található kitinhez kötődni képes fluoreszcens festék (Heilmann és mtsai. 2013), az MS12+*leuA* törzs mutatott szignifikánsan erősebb növekedést. Az elágazóláncú aminosav aminotranszferázok (BAT-ok) befolyásoló hatással vannak a rapamicin célpont komplex 1 (TORC1) szignál transzdukciós útvonalra, amely közvetett módon befolyásolja a sejtnövekedést és sejtfal összetételt (Kingsbury és mtsai. 2015), ily módon ez összefüggésben állhat a kapott eredményeinkkel. Az MS12+*leuA* törzs esetében szignifikánsan gyengébb növekedést tapasztaltunk 0,4 és 1 M NaCl koncentráció jelenlétében, valamint az MS12+*pyrG* törzs szignifikánsan gyengébb növekedést mutatott 1 M NaCl koncentráció mellett, míg szignifikánsan erősebb növekedést mutatott 5 % glükóz koncentráció jelenlétében. Illetve ezen törzsek tekintetében 1 M NaCl koncentráció esetében jelentős eltérést figyeltünk meg a hifák mikromorfológiájában is. Annak tekintetében, hogy a leucin auxotrófia hatással van a lipid anyagcserére (Zhang és mtsai. 2020) és az uracil auxotrófia hatással van a stressz adaptációra (Pan és mtsai. 2019) továbbá a foszfolipid bioszintézisre (Löffler és Zameitat 2013), illetve az ozmotikus stresszhez való adaptáció során jelentős változások mennek végbe a sejtmembrán lipid és szterin összetételében (Montañés és mtsai. 2011, Jordá és Puig 2020, Godinho és mtsai. 2021), így ezen eredményeink szoros összefüggésben állhatnak ezen jelenségekkel.

A csírázási képesség vizsgálata nagy jelentőséggel bír, mert a fertőzés kialakulásának, sikerességének és progressziójának szempontjából meghatározó, hogy a spórák mekkora %-a, mikor és milyen ütemben indul csírázásnak. Mind az MS12+*pyrG*, mind az MS12+*leuA* törzs esetében szignifikáns növekedést tapasztaltunk a csírázási képességben, amely nem csak a mintavételi időpontokban már csírázásnak indult spórák %-os arányában nyilvánult meg, hanem a csírázás megindulásának a leoltástól számított időpontjában is. Ezenfelül az

MS12+*leuA* törzs csírázási görbéje a 4. órával kezdődően meglehetősen nagy hasonlóságot mutat a CBS 277.49 törzs csírázási görbéjével. A spórák csírázás során a sejtfal és -membrán összetétel, illetve -szerkezet számos változáson megy keresztül, melyben fontos szerepe van a sejtfal és sejtmembrán bioszintézisben résztvevő géneknek. Így a csírázás megindulásakor, illetve annak folyamata alatt intenzív RNS- és fehérjeszintézis jellemző, mely folyamatokat nagymértékben befolyásolja a leucin és uracil auxotrófia (Moffatt és Ashihara 2002, Ljungdahl és Daignan-Fornier 2011, Kingsbury és mtsai. 2015, Jordá és Puig 2020, Que és mtsai. 2020, Zhang és mtsai. 2020).

Az *in vivo* virulencia vizsgálatok kivitelezéséhez *G. mellonella* infekciós modellt alkalmaztunk, melyek során szignifikáns növekedést tapasztaltunk az MS12+*pyrG* és MS12+*leuA* törzs virulenciájában, melyek a CBS 277.49 törzs virulenciájához hasonlóak. Míg az MS12 törzs esetében 15 %-os túlélést figyeltünk meg a vizsgálati időszak végén, addig az előbbi 3 törzs esetében a 4. napon az összes lárva elpusztult, illetve ezen törzseknél az 1. és 2. nap között volt a legmagasabb a halálozások száma. *Aspergillus fumigatus* esetében már vizsgálták az uracil (D’Enfert és mtsai. 1996) és leucin (Orasch és mtsai. 2019) auxotrófia virulenciát befolyásoló hatását, ahol azt tapasztalták, hogy ezen auxotrófiák nagymértékben képesek azt befolyásolni.

Mindezek alaposabb vizsgálatának érdekében teljes lipid és szterin összetételi vizsgálatokat tervezünk kivitelezni nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia - nagyfelbontású tömegspektrometria (HPLC - HRMS) és gáz kromatográfia – tömegspektrometria (GC - MS) analízis segítségével a továbbiakban.

7. Összefoglalás

Munkánk során célunk volt a leucin és uracil auxotrófia fiziológiát, továbbá virulenciát befolyásoló hatásának vizsgálata a *M. lusitanicus* vad típusú-, egyszeresen- és kétszeresen auxotróf törzseinek felhasználásával. Eredményeinket összehasonlítva a kísérleteinkhez felállított célkitűzésekkel, az alábbiak állapíthatók meg:

A *leuA* gén funkcionális változatát tartalmazó expressziós vektor konstrukció létrehozása, majd transzformálása egy leucin és uracil kétszeresen auxotróf mutáns törzsbe

Célunk egy olyan shuttle-vektor konstrukció létrehozása volt, mely tartalmazza a *M. lusitanicus leuA* génjének funkcionális változatát, továbbá fenttartható és felszaporítható *DH5α E. coli* baktériumsejtekben, valamint ennek PEG-mediált transzformációval történő bejuttatása egy leucin és uracil kétszeresen auxotróf mutáns törzsbe, komplementálva a leucin auxotrófiát és egy uracil egyszeresen auxotróf mutáns törzset létrehozva. Ezen vektor létrehozásához templátként a vad típusú CBS 277.49 törzsből származó genomi DNS-t, valamint a *leuA* génre specifikus primereket használtuk fel a gén PCR reakció általi felszaporításhoz, majd ezt sikeresen klónoztuk linearizált pJet 1.2 expressziós vektorba tompavégű ligálással. A *DH5α E. coli* kompetens sejtekbe történő transzformációt követően nagy mennyiségű és tisztaságú pJet+*leuA* plazmidot voltunk képesek izolálni. Ezt felhasználva sikeresen hoztunk létre számos uracil egyszeresen auxotróf mutáns *M. lusitanicus* törzset PEG-mediált transzformáció által, melyet pJet+*leuA* plazmid specifikus primer felhasználásával történő PCR reakcióval validáltunk.

A *M. lusitanicus* vad típusú-, leucin és uracil egyszeresen-, valamint kétszeresen auxotróf törzseinek fiziológiai vizsgálata

Célunk a leucin és uracil egyszeres-, valamint kétszeres auxotrófia fiziológiát befolyásoló hatásának vizsgálata volt. Elsőként a törzsek különböző tenyésztési hőmérsékleteken történő növekedési képességét vizsgáltuk. A CBS 277.49 vad típusú törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott 20-, 25- és 35 °C-on, míg 30 °C esetében nem tapasztaltunk jelentős eltérést. Az MS12+*leuA* törzs szignifikánsan gyengébb növekedést mutatott a 20- és 30 °C-on történő tenyésztés esetében, míg 25 °C esetén nem tapasztaltunk jelentős eltérést, továbbá szignifikánsan erősebb növekedést mutatott 35 °C-on. Az MS12+*pyrG* törzs egyedül a 20 °C-on történő tenyésztés 2. napján mutatott szignifikánsan gyengébb növekedést. A hifák mikromorfológiájában egyik esetben sem figyeltünk meg jelentős eltérést. Eredményeink alapján a leucin auxotrófia csekély mértékben van befolyásoló hatással a különböző tenyésztési hőmérsékletekhez történő adaptálódásra, míg az uracil auxotrófia ezt nagymértékben

befolyásolja. A mikroaerofil körülmények között történő növekedési képesség vizsgálata során a CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb-, míg az MS12+*leuA* törzs szignifikánsan gyengébb növekedést mutatott. Az élesztő-hifa sejttípus váltási vizsgálat során mindegyik törzs esetében csak élesztőszerű sejteket figyeltünk meg. Ezen eredmények alapján az uracil auxotrófia jelentősen befolyásolja a növekedési képességet mikroaerofil körülmények között, azonban az élesztő-hifa sejttípus váltási képességet sem az uracil-, sem a leucin auxotrófia nem befolyásolja jelentősen. A stressz indukálószerke jelenlétében történő növekedési képesség vizsgálata során a CBS 277.49 törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott kongó vörös, kalkofluór fehér, SDS, 0,4 M NaCl és 5 % glükóz jelenlétében. Az MS12+*leuA* törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott kalkofluór fehér jelenlétében, azonban jelentősen gyengébb növekedést mutatott 0,4- és 1 M NaCl jelenlétében. Az MS12+*pyrG* törzs szignifikánsan erősebb növekedést mutatott 5 % glükóz jelenlétében, míg jelentősen gyengébb növekedést mutatott kongó vörös és 1 M NaCl jelenlétében. A hifák mikromorfológiájában egyedül az 1 M-os NaCl koncentráció esetében figyeltünk meg jelentős eltérést, ahol az MS12+*pyrG* törzs spóráinak csírázása jelentős mértékben gátolt volt, míg az MS12+*leuA* törzs spórái csak csekély mértékben voltak képesek csírázni. Eredményeink alapján elmondható, hogy a leucin- és az uracil auxotrófia is befolyásoló hatással rendelkezik a sejtfal stresszt-, illetve ozmotikus stresszt kiváltó stressz indukálószerke jelenlétének szempontjából. A sporulációs képesség vizsgálata során szignifikáns eltérést egyik törzs esetében sem tapasztaltunk. A csírázási képesség vizsgálata során mind a CBS 277.49, az MS12+*leuA* és MS12+*pyrG* törzs esetében szignifikáns növekedést figyeltünk meg, valamint eredményeink azt mutatják, hogy a leucin auxotrófia komplementációjának köszönhetően a csírázási képesség visszaállt a vad típusú törzséhez közel megegyező szintre, míg a leucin és uracil kétszeres auxotrófia nagymértékben gátolja a csírázást.

***In vivo* virulencia vizsgálata *Galleria mellonella* infekciós modell segítségével**

A leucin és uracil auxotrófia virulenciát befolyásoló hatásának vizsgálatához *Galleria mellonella* *in vivo* infekciós modellt alkalmaztunk. Ezen vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy mind a leucin-, mind az uracil auxotrófia komplementálásának köszönhetően a virulencia szignifikánsan megnövekedett és a CBS 277.49 vad típusú törzsével közel megegyezővé vált, míg a leucin és uracil kétszeres auxotrófia jelentősen csökkent a virulenciát.

További tervek

További terveink között szerepel a munkánk során vizsgált törzsek által létrehozott spórák méretének meghatározása áramlási citometriával, a törzsek különböző antifungális szerekkel

(amfotericin B, azolok) szembeni érzékenységeinek vizsgálata, továbbá a törzsek lipid és szterin összetételének meghatározása HPLC-HRMS és GC-MS vizsgálatok segítségével. Ezenfelül tervezzük az egyszeres auxotróf mutánsok komplementálását.

8. Köszönet nyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba (egykori) Prof. Dr. Papp Tamás (jelenlegi) tanszékvezető egyetemi tanároknak, hogy lehetővé tette, hogy a szakdolgozásomat az SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén végezzem.

Hatalmas köszönettel tartozom a témavezetőmnek, Prof. Dr. Papp Tamásnak minden gyakorlati és szakmai segítségért, amit a munkám során nyújtott nekem, továbbá a sok gyakorlati tanácsért a labormunkával és módszerekkel/technikákkal kapcsolatban.

Nagy köszönettel tartozom mentoromnak, Rafael Bence PhD hallgatónak minden szakmai segítségért, amit a munkám során nyújtott számomra, valamint minden elvégzett gyakorlatért.

Valamint köszönöm az SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológia Tanszék 312-es számú labor minden dolgozójának a sok segítséget és tanácsot, amit tőlük kaptam.

9. Irodalomjegyzék

- Badali H, Cañete-Gibas C, McCarthy D, Patterson H, Sanders C, David MP, Mele J, Fan H, Wiederhold NP. Epidemiology and Antifungal Susceptibilities of Mucoralean Fungi in Clinical Samples from the United States. *J Clin Microbiol.* 2021 Aug 18;59(9):e0123021.
- Benny GL, Humber RA & Voigt K. 2014. 8 Zygomycetous Fungi: Phylum Entomophthoromycota and Subphyla Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. *Systematics and Evolution*, 209–250.
- D'Enfert C, Diaquin M, Delit A, Wuscher N, Debeaupuis JP, Huerre M, Latge JP. Attenuated virulence of uridine-uracil auxotrophs of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 1996 Oct;64(10):4401-5.
- Garvey M, Rowan NJ. Pathogenic Drug Resistant Fungi: A Review of Mitigation Strategies. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 13;24(2):1584. doi: 10.3390/ijms24021584.
- Godinho CP, Costa R, Sá-Correia I. 2021. The ABC transporter Pdr18 is required for yeast thermotolerance due to its role in ergosterol transport and plasma membrane properties. *Environ Microbiol.* 2021 Jan; 23(1): 69–80.
- GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com
- Heilmann CJ, Sorgo AG, Mohammadi S, Sosinska GJ, de Koster CG, Brul S, de Koning LJ, Klis FM. 2013. Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2013 Feb; 12(2): 254–264.
- Homa M, Ibragimova S, Szebenyi C, Nagy G, Zsindely N, Bodai L, Vágvölgyi C, Nagy G, Papp T. Differential Gene Expression of *Mucor lusitanicus* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *J Fungi (Basel).* 2022 Apr 15;8(4):404.
- Hüttel W and Hoffmeister D. 2010. Fungal biotransformations in pharmaceutical sciences. *Industrial Applications. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research) Volume 10* Springer.
- Johnston EJ, Moses T, Rosser SJ. 2020. The wide-ranging phenotypes of ergosterol biosynthesis mutants, and implications for microbial cell factories. *Yeast.* 2020 Jan;37(1):27-44. doi: 10.1002/yea.3452.
- Jordá T and Puig S. 2020. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes (Basel).* 2020 Jul; 11(7): 795.
- Kingsbury JM, Sen ND, Cardenas ME. Branched-Chain Aminotransferases Control TORC1 Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2015 Dec 11;11(12):e1005714.
- Ljungdahl, PO, Daignan-Fornier, B. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2012; 190, 885 - 929.
- López-Malo M, Chiva R, Rozes N, Guillamon JM. 2013. Phenotypic analysis of mutant and overexpressing strains of lipid metabolism genes in *Saccharomyces cerevisiae*: implication in growth at low temperatures. *Int J Food Microbiol.* 2013 Mar 1;162(1):26-36.

Löffler M, Zameitat E. Pyrimidine Biosynthesis and Degradation (Catabolism). Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition). 2013. Pages 712-718

Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. Bioinformatics. 2004 Oct 12;20(15):2471-2. doi: 10.1093/bioinformatics/bth254.

Moffatt BA, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. Arabidopsis Book. 2002;1:e0018.

Montañés FM, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2011. Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. Mol Microbiol. 2011 Feb;79(4):1008-23.

Morin-Sardin S, Nodet P, Coton E, Jany JL. 2017. Mucor: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. Fungal Biology Reviews, 31(1), 12-32.

Nout MJR and Aidoo KE. 2010. Asian fungal fermented food. Industrial Applications. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research) Volume 10 Springer.

Orasch T, Dietl AM, Shadkchan Y, Binder U, Bauer I, Lass-Flörl C, Oshero N, Haas H. The leucine biosynthetic pathway is crucial for adaptation to iron starvation and virulence in *Aspergillus fumigatus*. Virulence. 2019 Dec;10(1):925-934.

Pan D, Wiedemann N, Kammerer B. Heat Stress-Induced Metabolic Remodeling in *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolites. 2019 Nov 5;9(11):266.

Prakash H, Chakrabarti A. Epidemiology of Mucormycosis in India. Microorganisms. 2021 Mar 4;9(3):523. doi: 10.3390/microorganisms9030523.

Que Y, Yue X, Yang N, Xu Z, Tang S, Wang C, Lv W, Xu L, Talbot NJ, Wang Z. Leucine biosynthesis is required for infection-related morphogenesis and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Curr Genet. 2020 Feb;66(1):155-171.

Regan J, DeJarnette C, Luna-Tapia A, Parker JE, Reitler P, Barnett S, Tucker KM, Kelly SL, Palmer GE. 2022. Titration of C-5 Sterol Desaturase Activity Reveals Its Relationship to *Candida albicans* Virulence and Antifungal Susceptibility Is Dependent upon Host Immune Status. mBio. 2022 Apr 26;13(2):e0011522.

Roncero MI, Jepsen LP, Strøman P, van Heeswijk R. 1989. Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. Gene. 1989 Dec 14;84(2):335-43.

Sahu RK, Salem-Bekhit MM, Bhattacharjee B, Almoshari Y, Ikbali AMdA, Alshamrani M, Bharali A, Salawi A, Widyowati R, Alshammari A, and Elbagory I. 2021. Mucormycosis in Indian COVID-19 Patients: Insight into Its Patho-Genesis, Clinical Manifestation, and Management Strategies. Antibiotics (Basel). 2021 Sep; 10(9): 1079.

Sigoillot FD, Kotsis DH, Masko EM, Bame M, Evans DR, Evans HI. Protein kinase C modulates the up-regulation of the pyrimidine biosynthetic complex, CAD, by MAP kinase. Front Biosci. 2007 May 1;12:3892-8. doi: 10.2741/2358.

Szebenyi C, Gu Y, Gebremariam T, Kocsubé S, Kiss-Vetráb S, Jáger O, Patai R, Spisák K, Sinka R, Binder U, Homa M, Vágvölgyi C, Ibrahim AS, Nagy G, Papp T. *coH* Genes Are Necessary for Normal Spore Formation and Virulence in *Mucor lusitanicus*. *mBio*. 2023 Feb 28;14(1):e0338622.

van Heeswijk R, Roncero MI. 1984. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun* 49: 691-702.

Vasudevan B, Hazra N, Shijith KP, Neema S, Vendhan S. 2021. Mucormycosis: The Scathing Invader. *Indian J Dermatol*. 2021 Jul-Aug; 66(4): 393–400.

Walther G, Wagner L, Kurzai O. 2019. Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa. *J Fungi (Basel)*. 2019 Dec; 5(4): 106.

Xisto MIDDS, Rollin-Pinheiro R, Rochetti VP, Castro-Almeida Y, Borba-Santos LP, Santos-Freitas GMPD, Cypriano J, Abreu FÁ, Rozental S, Barreto-Bergter E. Miltefosine: A Repurposing Drug against Mucorales Pathogens. *J Fungi (Basel)*. 2023 Dec 4;9(12):1166.

Xiuping H, Lichun Q, Cheng Y, Xuena G. Uracil auxotrophic *Hansenula polymorpha* and preparation method and application thereof. 2012. (Chinese Patent No. CN107418967B). China.

Zhang L, Li F, Guo Q, Duan Y, Wang W, Zhong Y, Yang Y, Yin Y. Leucine Supplementation: A Novel Strategy for Modulating Lipid Metabolism and Energy Homeostasis. *Nutrients*. 2020 May 2;12(5):1299.