

XXXI. OTDK Biológia Szekció

RNS interferencia vizsgálata az opportunista patogén

***Candida parapsilosis*-ban**

Készítette:

Ámon Judit

biológus hallgató

MSc II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Hamari Zsuzsanna

egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1 Szekretált lipáz, mint virulencia faktor	5
2.2 RNS interferenciáról általában.....	6
2.3 miRNS biogenezis állatokban.....	7
2.4 RNS interferencia gombákban.....	7
3. Célkitűzések	10
4. Anyagok és módszerek	11
4. 1. Felhasznált törzsek	11
4. 2. Tápoldatok, táptalajok	11
4.3. Plazmid DNS preparáláshoz használt oldatok	12
4.4. Agaróz gélelektroforézishez használt oldat.....	12
4.5. Totál DNS izoláláshoz felhasznált oldat	12
4.6 Célzott régiók	13
4.7 PCR reakciók.....	13
4.8 Lipáz aktivitásmérés fluorimetriás módszerrel.....	17
4.9 DNS gélelektroforézis.....	17
4.10 PCR termékek tisztítása	18
4.11 Vektor defoszforilálása	18
4.12 Tisztított PCR termékek preparatív futtatása és vektorba ligálásuk	18
4.13 <i>E. Coli</i> sejtek transzformálása.....	18
4.14 Plazmid DNS izolálás: „MiniPrep-ek” készítése.....	18
4.15 Plazmid DNS izolálás: „MaxiPrep-ek” készítése.....	19
4.16 <i>Candida parapsilosis</i> kompetens sejtek készítése.....	20
4.17 <i>Candida</i> sejtek transzformációja.....	20
4.18 RNS izolálás.....	21
4.19 cDNS írás	21
4.20 RT-PCR.....	21

4.21 Totál DNS kivonás "plazmid rescue"-hoz	21
4.22 Lipáz aktivitásmérés	22
4.23 Statisztikai mérési módszer szignifikancia megállapítására	22
5. Eredmények és értékelés	23
5.1 A <i>LIP2</i> gén csendesítés céljából 3 különböző <i>LIP2</i> mRNS szakaszt targetáló konstrukciók megtervezése és elkészítése	23
5.2. A pGiZi-S1Si, -S2Si és -S3Si konstrukciók, valamint pGiZi vektor bejuttatása <i>C. parapsilosis</i> GA1 vad típusú törzsbe	30
5.3. RNS kivonás, cDNS írás és kvantitatív Real-Time PCR (qRT-PCR) végrehajtása az Si-konstrukciókat hordozó törzsekből, valamint az üres pGiZi vektort hordozó kontrol törzsből	31
5.4. Lipáz enzimaktivitások mérése az Si-konstrukciókat kifejező és az üres pGiZi vektort hordozó transzfórmánsokból.....	33
6. Összefoglalás	34
7. Referenciajegyzék	35
8. Köszönetnyilvánítás	38
9. Nyilatkozat a hallgató egyéni hozzájárulásáról	39

1. Bevezetés

Az elmúlt néhány évtizedben jelentősen megemelkedett a gombafertőzésekben szenvedők száma, komoly népegészségügyi problémát jelentve világszerte. Az elsődleges fontosságú opportunisták kórokozók között a *Candida* nemzetség tagjai előkelő helyet foglalnak el (1). Klinikai izolátumokból leggyakrabban a *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és *C. krusei* fajokat azonosították. Az európai invazív candidiázis 95%-áért főként ezek a fajok tehetők felelőssé (1).

A *C. albicans* osztálya főként opportunisták humán patogén gombákat foglal magába, melyek a természetes humán flóra részei (2). A gomba és szervezetünk közötti bonyolult kölcsönhatás biztosítja a mikroorganizmusok szaporodásának ellenőrzését. Kis számban megtalálhatók a szájüregben, a bőrön, a légzőszerv, az emésztőrendszer és a genitális nyálkahártyákon is. Betegséget csak az immunrendszer nem megfelelő működése esetén okozhatnak, amikor túlzott elszaporodásuk lehetővé válik.

A fertőzés fokozottan veszélyeztetett célpontjai az immunszuppresszált betegek: sugárkezelésen, kemoterápián, szervátültetésen átesett egyének, HIV fertőzöttek, újszülöttek, immun gyenge idős emberek. Cukorbetegség, mellékvese-, pajzsmirigybetegek, széles spektrumú antibiotikumok és egyes kábítószereszedése is hajlamosító tényezőként része lehet annak, hogy az addig humán kommenzalista gombák virulencia faktoraik segítségével képesek legyenek különböző kórfolyamat kialakítására a gazdaszervezetben. A kellemetlen bőrelváltozással járó felszíni fertőzésektől (candidiázis, csecsemőknél szájpenész, pelenkadermatitisz, nőknél vulvovaginitis) kezdve a véráramba kerülve súlyos fertőzést, candidémiát is okozhatnak, melynek életveszélyes szepszis lehet a következménye. Számos egyéb gyakori betegség kórokozói, úgymint meningitis, arthritis, otomycosis, onychomycosis és okuláris fertőzések. Biofilm képző képességüknek köszönhetően a nosocomialis fertőzések előidézésében is jelentős szerepet játszanak. Implantátumokon, katétereken, valamint egyéb orvosi eszközökön is képesek kitapadni, komoly problémákat eredményezve a kórházi ellátásban (2,3,4).

A *Candida* fertőzés számos virulencia faktor közreműködésével alakul ki, melyeknek esszenciális szerepük van a patomechanizmus kialakításában. Nélkülük a patogén nem lenne képes kóros kolonizációra. Ezek közé tartoznak a gazdasejten való kitapadás (a sejtfal, az adhézións fehérjék), a biofilm képzésben résztvevő faktorok, a gomba élesztő /hifa morfofenetikai átváltozásának képessége, valamint a hidrolitikus enzimek szekréciója (pl. lipázok és proteázok) (4,5,6,7).

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Szekretált lipáz, mint virulencia faktor

A hidrolitikus enzimek (pl. foszfolipázok, proteázok, lipázok) a gazdasejt membrán alkotóinak, különféle szerves és szervetlen vegyületeinek átalakítására képesek. Peptid- és észter kötéseket, foszfolipideket hidrolizálnak, ami a membrán destabilizálását, fizikai szétesését vonhatja maga után. Ezzel az enzimek lehetővé teszik a mikroorganizmusok számára, hogy a gazdasejt makromolekuláit táp- és energiaforrásként hasznosítsák, nagyban megkönnyítve ezzel a gomba szétterjedését a szervezetben.

A lipázok növényekben, állatokban és mikrobiális szervezetekben egyaránt természetes biokatalizátorokként vannak jelen. A trigliceridek észter kötéseinek hidrolízisét végzik, aminek eredményeként zsírsavak és glicerín keletkezik (4).

A *C. albicans* molekuláris vizsgálatai során a szekretált lipázok 10 génből álló géncsaládját azonosították (*LIP1-LIP10*) (6,7). Az organizmus diploid természete miatt egy lipázt nem termelő null mutáns létrehozása 20 gén kiütését jelentené. A jelenleg használatban lévő deléciós eljárásokkal egy ilyen törzs létrehozása időigényes, és a halmazható génkiütések száma is limitált, ugyanis a rekombinációs rendszer működését biztosító, genomba ékelődő elemeken keresztül nagyfokú genomátrendeződést eredményezhetnek, aminek pedig fenotipikus változás lehet a következménye. Ennek a nehézségnek az áthidalására jelenthet megoldást az RNS interferencia (RNSi) alkalmazása. Annak tesztelésére és bizonyítására, hogy RNS interferenciával csendesíteni lehet a lipáz virulencia faktort *Candida* fajokban, a *C. parapsilosis*-t használva modellszervezetként kidolgoztunk egy teszt csendesítő rendszert, amely jelen dolgozatban kerül bemutatásra.

C. parapsilosis esetében csak 2 lipáz kódoló gént különítettek el, *CpLIP1* és *CpLIP2*-t (2,8,9,10). Ezek igen nagyfokú azonosságot mutatnak már nukleotid (nt) szinten is (65,3% nt azonosság), amely felveti a funkcionális azonosság lehetőségét is. *Saccharomyces cerevisiae*-ben és *Pichia pastoris*-ban való expresszáltatáskor azonban csak egyikük, a *CpLip2* bizonyult aktív fehérjének, míg *CpLip1* nem mutatott aktivitást (8). Az egyedüli aktív fehérjét nem termelő *CpLIP2* deletált mutánsok csökkent virulenciát mutattak egér és humán makrofág killing assay-ekben és *in vitro* szöveti fertőzés kísérletekben (9). Mindezek alapján a *C. parapsilosis* alkalmas modell arra, hogy teszteljük a *CpLIP2* gént csendesítő RNS interferencia működésének hatékonyságát.

2.2 RNS interferenciáról általában

Az RNS interferencia rövid, duplaszálú RNS-molekulák által kiváltott, konzervált molekuláris mechanizmus. Génkifejeződésre való gátló hatásukat *Caenorhabditis elegans*-ban fedezték fel (11,12). Két útvonalon keresztül valósulhat meg: transzkripcionálisan (TGS – transzkripcionális géncsendesítés) és poszttranszkripcionálisan (PTGS – poszttranszkripcionális géncsendesítés). Növényekben a PTGS a sejtmagban a Cajal-testekben, valamint a citoplazmában a P-testekben zajlik, míg állati szervezetekben csak a P-testekben (13). A sejtmagban az siRNS-ek a transzkripció csendesítését inaktív kromatin kialakításával érik el siRNS által iniciált RITS komplexek összeszerelődése és aktivitása révén, ami tartós csendesítés esetén lokális heterokoromatin képződéshez vezet (14). A citoplazmában jelen lévő miRNS-ek belső, poszttranszkripcionális regulátorként funkcionálnak, az siRNS-ek pedig a vírusok, transzpozonok, repetitív elemek elleni védelmet szolgálnak (15). A folyamat megvalósulásához mind si-, mind pedig miRNS esetén kétszálú RNS (dsRNS) létrejötte, RNáz III, Argonauta (AGO) és az erre szerveződő RISC komplex szükséges (15).

A dsRNS biogenezisnek többféle módja ismert élő szervezetekben. Lehetnek a génekben kódolt miRNS-ek, melyek szekvenciája lehetővé teszi azt, hogy önmagukban párosodó és kihurkolódó másodlagos szerkezetet vegyenek fel (16). Létrejöhetnek a génben kódolt inverted repeatekből, vagy akkor, ha egy RNS függő RNS polimeráz (RdRP) az mRNS-ről elvégzi az ellentétes szál átirását (16). Előfordulhat olyan eset is, mikor egy adott genomi szekvencia átirása mindkét irányból megtörténik, és a keletkező sense és antisense szál dsRNS-t formál (16).

Szükség van egy RNáz III aktivitással rendelkező fehérjére (Dicer), mely képes a dsRNS hasítására. A hasítás eredményeképpen 5' monofoszfát és 3' végen 2 nt túlnyúló rész keletkezik (15). Különböző szervezetek eltérő számú Dicer fehérjével rendelkeznek. *Schizosaccharomyces pombe*-nak, *C. elegans*-nak és az emlősöknek 1, *Drosophila melanogaster*-nek 2, *Arabidopsis*-nak 4 ehhez hasonló enzime van (17).

Az Argonauta (Ago) fehérjék feladata a dsRNS-ek felismerése, megkötése és csendesítő komplexbe szervezése több fehérje közreműködésével, ami a sejtmagban a RITS (14), a citoplazmában a RISC-nek nevezett enzim komplexet jelenti (15). Ezek a komplexek az Ago felépítésétől függően lehetnek hasító vagy nem hasító enzim komplexek (15). A targetált mRNS sorsa a RISC-ben lévő Argonauta RNS hasító aktivitásának meglététől-, illetve hiányától-, valamint a mRNS és az interferáló kis RNS között fennálló

komplementaritás mértékétől függ (15). Teljes komplementaritás és RNS hasító képességgel bíró Argonauta esetén a targetált mRNS RISC komplexen történő elhasítása és ezt követően a mRNS degradációja bekövetkezhet (15). Azonban valamelyik feltétel elmaradása esetén a RISC komplex a targetált mRNS-el együtt eljut a riboszómákhoz és a mRNS kifejeződése a transláció gátlásán keresztül fog megvalósulni (15).

2.3 miRNS biogenezis állatokban:

A miRNS gének a genomban kódoltak. Átírásukat az RNS polimeráz II enzim végzi, melynek terméke az elsődleges miRNS (pri-miRNS/primary miRNS), ami 5' 7-metilguanozin sapkát és 3' poli(A) farkat visel (18,19). Jellegzetes másodlagos struktúrát vesz fel, ami duplaszálú párosodási szakaszokat és kihurkolódásokat (stem loop) tartalmaz. Ez a pri-miRNS transzkript a sejtmagban belép egy mikroprocesszornak nevezett nagy enzim komplexbe (500-650 kDa), ahol a Drosha (RNáz III endonukleáz), az esszenciális kofaktor, a Pasha (2 dsRNS kötő doménnel rendelkező fehérje) közreműködésével 70 nt hosszú szakaszokra darabolja, létrehozva ezzel a prekursor- vagy pre-miRNS-t (18). A pre-miRNS hordozza az RNáz III hasítás jegyeit, azaz 5' monofoszfát és 3' végen 2 nt túlnyúló hidroxil csoportot tartalmaz. A pre-miRNS-ek az Exportin-5 (Ran szállító receptor család tagja, dsRNS kötő doménnel) segítségével a magból a citoplazmába szállítódnak (18). A citoplazmában fejeződik be a miRNS biogenezise, amikor a Dicer (RNáz III endonukleáz) a 70 nt hosszú pre-miRNS-eket 21-23 nt hosszú érett, duplaszálú miRNS-ekké darabolja (14). Ehhez a miRNS-hez kötődik az Argonauta, amely köré a P-testekben RISC komplex (RNA-induced silencing complex) szerveződik (13). Ez több olyan fehérjét tartalmaz, melyek a miRNS target mRNS felismerését segítik. Helikázok működése révén a miRNS duplex és a RISC is kettéhasad (17). Az 5' végen energetikailag stabilabb szállal (passenger/sense) kapcsolódó RISC rész degradálódik, míg az 5' végen energetikailag kevésbé stabil szálat (vezető/guide/antisense szálat) hordozó RICS komplex tovább haladva géncsendesítést indukál (18).

2.4 RNS interferencia gombákban:

2.4.1 Fon alas gombák:

Romano és mtsai 1992-ben leírtak egy géncsendesítő jelenséget *Neurospora crassa*-ban, amit quellingnek nevezték el (20). Eredetileg homológ ismétlődő szekvenciák által kiváltott, a génexpresszió reverzibilis inaktivációjaként írták le. Genetikai és biokémia vizsgálatok eredményei alapján feltételezték, hogy a quelling az RNS mediált géncsendesítő

mechanizmus egy kategóriája, és azonosították a *C. elegans* és *Arabidopsis* RNS interferenciában résztvevő komponensek homológjait. A folyamat az állatokban meghatározott alapmechanizmushoz hasonlóképpen zajlik. A bejuttatott, endogén génnel homológ szekvenciák következtében keletkezett hibás, rendellenes RNS-ből itt is egy RdRP, a Qde-1 készíti dsRNS-t, amelyet a Dcl-2 Dicer 21-23 nt hosszú siRNS-ekké hasít. Ezt követően az Argonauta segítségével, a Qde-2 fehérjével a siRNS-ek RISC komplexbe szerveződnek. A RISC komplexben a Qde-2 végzi a homológ mRNS hasítását (20). A gomba ezzel a folyamattal egyedülálló módon biztosítja haploid genomjának megőrzését.

A *N. crassa* vegetatív növekedési fázisban haploid, azonban 2 ellentétes párosodási típusú haploid mag találkozásakor átmeneti diploid sejtet, zigótát hoz létre. A zigóta meiózison megy keresztül, mialatt a homológ kromoszómák is párosodnak. Abban az esetben, ha a két kromoszóma nem teljesen komplementer egymással, párosítatlan DNS szakasz jön létre, ami kihurkolódik. Ez a kihurkolódó DNS lesz a *N. crassa*-ban felfedezett másik RNS függő csendesítő folyamat, a meiotikus silencing kiváltója. A hibás RNS átírását dsRNS-sé a Sad-1 RdRP végzi. A dsRNS-t az Sms-3 Dicer darabolja fel rövid siRNS-ekké, amik a RISC komplexben lévő Sms-2 Argonauta-val a mRNS hasítását idézik elő (20, 21, 22).

2.4.2 Sarjadzó gombák:

Az RNSi evolúciósan konzervált mechanizmusnak bizonyult az alapján, hogy a növényekben, állatokban és gombákban erősen konzervált RdRP, Dicer és Argonauta fehérjéket azonosítottak, mint az interferencia hajtóelemei. 2009-ig bizonytalan volt, hogy van-e a sarjadzó élesztőkben RNS interferencia mechanizmus, ugyanis annak ellenére, hogy RdRP-t és Argonauta-t kódoló géneket azonosítottak egyes fajokban (*S. castellii*, *Kluyveromyces polysporus* és *C. albicans*), és pl. *S. castellii*-ben kis RNS populáció létezését is igazolták (23), Dicer-t sosem találtak. Amikor *S. castellii*-ben siRNS (transzpozábilis elemek, Y' subtelomerikus ismétlődések) jelenlétében Dicer-szerű aktivitást mutattak ki, rátaláltak egy nem-kanonikus felépítésű Dicer-re, amelyről bebizonyították, hogy homodimer formában teljes Dicer funkciót képes ellátni (23). Érdekes, hogy a molekuláris vizsgálatok fő modellszervezeteként ismertté vált sarjadzó élesztőben, a *S. cerevisiae*-ben sem nem-kanonikus élesztő Dicer-t, sem RdRP-t, sem pedig Argonauta géneket nem találtak és az RNS interferencia működését sem sikerült kimutatni. Amikor a *S. castellii* Argonauta és nem-kanonikus Dicer-ét bejuttatták és kifejeztették GFP proteint termelő *S. cerevisiae*-ben, majd ebbe a törzsbe GFP mRNS-t targetáló csendesítő konstrukciót is fejeztettek ki, akkor a kísérlet eredményeképpen a GFP sikeres csendesítését érték el (23). Ez volt a kísérletes

bizonyítása annak, hogy például *C. albicans*-ban, *K. polysporus*-ban, *S. castellii*-ben az Argonauta és a nem-kanonikus Dicer együttesen elegendőek az RNSi feladatok elvégzésére, ami kiváló módszer lehet géncsendesítő kísérletek elvégzéséhez (23).

Annak ellenére, hogy a fenti áttörő erejű kísérletet 2009-ben publikálták, azóta sem született olyan kiadvány, amiben beszámoltak volna sikeres csendesítésről *C. albicans*-ban.

3. Célkitűzések

Célunk a *C. parapsilosis* egyik virulencia faktorának, a *CpLIP2* génnek a csendesítése egy RNS interferenciát indukáló konstrukció felépítésével és transzformálásával *C. parapsilosis*-ba.

4. Anyagok és módszerek

4. 1. Felhasznált törzsek

- *Candida parapsilosis* GA1- vad típusú törzs
- *Escherichia coli* XL1-Blue

4. 2. Tápoldatok, táptalajok

4.2.1. LB oldat:

- 1% NaCl
- 1% Tripton
- 0,5% yeast extract
- szelekciós körülmény esetén 100 µg/ml ampicillin
- (2,5% agar táptalaj esetén)

4.2.2. YPD tápoldat:

- 1% pepton
- 1% glükóz
- 0,5% yeast extract
- 50 µg/ml nourseotrichin (NAT)
- (2,5% agar táptalaj esetén)

4.2.3. YNB tápoldat:

- 1x YNB
- 2% steril olívaolaj
- 50 µg/ml NAT

4.2.4. Lipáz aktivitás mérésére használt táptalaj:

- 2% agar
- 2% steril olívaolaj
- 5% steril FBS (Fetal Bovine Serum)
- 4 mg/ml 1 M Rhodamin-B oldat

- 50 µg/ml NAT

4.3. Plazmid DNS preparáláshoz használt oldatok

4.3.1. GET 100 ml-re

- 2,5 ml 1 M Tris pH 5.7 (25 mM)
- 2 ml 0,5 M EDTA pH 8 (10 mM)
- 0,9 g glükóz

4.3.2. Alkalikus SDS 10 ml-re:

- 8,8 ml desztillált víz
- 2 ml 10%-os SDS
- 200 µl 10 M NaOH

4.3.3. High Salt oldat 100 ml-re:

- 29,4 g K-acetát
- 28,5 ml desztillált víz
- 11,5 ml jégcet
- pH 4,6

4.4. Agaróz gélelektroforézishez használt oldat

- 100 ml 1x TAE
- 0,8 g agaróz
- 10 µl EtBr (etídium bromid 10 mg/ml oldata)
- 6x loading oldat (Fermentas)
- MassRuler DNS Molecular weight marker Mix (Fermentas)

4.5. Totál DNS izoláláshoz felhasznált oldat

4.5.1. Lízis puffer:

- 1% SDS
- 50 mM EDTA
- 100 mM Tris (pH 8)

4.6 Célzott régiók

4.6.1 *CpLIP2* gén célzott S1 régiója:

CATTGCTTTCAATCACTTATCGTTTGGGAAACACTCACTGTTTGCTTGATGGTGGTATTGCT
TATTTTCGGTAAATCATTCTTTTCCAGAATTATTAGATATTTCCCTGATGGATGGGATCTTGT
CAACCAAGAACCTATCAAAACCATCTTGCAAGATAATGGATTGGTTTACCAACCAAAGGACT
TGACCCCAACAAATTCCATTATTCATCTACCACGGTACCTTGGATGCAATTGTCCCCATTGTC
AACTCAAGAAAGACATTCC

4.6.2 *CpLIP2* gén célzott S2 régiója:

ATGGTGTGATTGGGGACTCAAATCTGGTGAATATAATGAAGATTTGACCAATGGACACATTA
CTGAATCAATTGTGGGTGCACCAGCTGCTTTGACTTGGATTATCAATCGTTTCAATGGACAG
CCTCCAGTTGATGGATGTCAACATAATGTGAGAGCTTCAAACCTGGAATATCCAGGAACTCC
ACAATCAATCAAGAATTACTTTGAAGCTGCATTGCACGCAATTTTGGGCTTTGATTTGGGTC
CAGATGTTAAGAGAGATAAGGTTACTTTGGGCGGATTGCTCAAGTTGGAACGTTTGTCTTTT

4.6.3 *CpLIP2* gén célzott S3-as régiója:

GATAAGGTACTTTGGGCGGATTGCTCAAGTTGGAACGTTTGTCTTTTAGATGATGTAAAA
CATTGCGTTTAGAAATTTGTATCATTATGTACAGAATGTATTATTAGTTTGATTTAGAAGAA
ACCTGTTTTGCAGACAGATG

4.7 PCR reakciók

4.7.1 PCR reakciókhoz használt primerek:

Név: CaRad6i2 Hind frw

Oligonukleotid (43-mer):

5'- AAAAAAAAGCTTGTACGTATAAATATATCAAAATAACCCCTTC -3'

Név: CaRad6i2 Pst rev

Oligonukleotid (46-mer):

5'- AAAAAACTGCAGCTAAAAAAGGAAGTAGTTATATATGTTAG -3'

Név: CpSiLip2 XhoNco S1 frw

Oligonukleotid (45-mer):

5'- TTTTTTCTCGAGCCATGGCTTTCAATCACTTATCGTTTGGGAAAC -3'

Név: CpSiLip2 Hind S1 rev

Oligonukleotid (39-mer):

5'- TTTTAAAGCTTGAATGTCTTTCTTGAGTTGACAATGG -3'

Név: CpSiLip2 SmaI AS1 frw

Oligonukleotid (44-mer):

5'- TTTTTCCTCCGGGCATTGCTTTC AATCAC TTATCGTTTGGGAAAC -3'

Név: CpSiLip2 Pst AS1 rev

Oligonukleotid (39-mer):

5'- TTTTCTCTGCAGGGAATGTCTTTCTTGAGTTGACAATGG -3'

Név: CpSiLip2 XhoNco S2 frw

Oligonukleotid (40-mer):

5'- TTTTCTCTCGAGCCATGGTGTGATTGGGGACTCAAATCTG -3'

Név: CpSiLip2 Hind S2 rev

Oligonukleotid (41-mer):

5'- TTTTAAAGCTTAAAAGCAAAACGTTCCAAC TTGAGCAATC -3'

Név: CpSiLip2 SmaI AS2 frw

Oligonukleotid (38-mer):

5'- TTTTTCCTCCGGGATGGTGTGATTGGGGACTCAAATCTG -3'

Név: CpSiLip2 Pst AS2 rev

Oligonukleotid (41-mer):

5'- TTTTCTCTGCAGAAAAGCAAAACGTTCCAAC TTGAGCAATC -3'

Név: CpSiLip2 XhoNco S3 frw

Oligonukleotid (41-mer):

5'- TTTTCTCTCGAGCCATGGGGTTACTTTGGGCGGATTGCTC -3'

Név: CpSiLip2 Hind S3 rev

Oligonukleotid (38-mer):

5'- TTTTAAAGCTTCATCTGTCTGCAAAACAGGTTTCTTC -3'

Név: CpSiLip2 Sma AS3 frw

Oligonukleotid (39-mer):

5'- TTTTCCCGGGGATAAGGTTACTTTGGGCGGATTGCTC -3'

Név: CpSiLip2 Pst AS3 rev

Oligonukleotid (38-mer):

5'- TTTTCTGCAGCATCTGTCTGCAAAACAGGTTTCTTC -3'

Név: Cp S2 pAct EV frw

Oligonukleotid (40-mer):

5'- TTTTGTGATATCCAGTTTCAATTCTCACTCAATTCTCAC -3'

Név: Cp S1S2S3 pAct EV NcoI rev

Oligonukleotid (39-mer):

5'- TTTTGTGATATCCCATGGTGTGAGGTCGAATGTCGAAC -3'

Név: Cp S1S2S3 tGal Sma frw

Oligonukleotid (38-mer):

5'- TTTTTCCTCCCGGGACCTTATGTACACTCGCTTAATGTC-3'

Név: Cp S2 tGal Sma rev

Oligonukleotid (33-mer):

5'- TTTTTCCTCCGGGTTCTTGCCACTTTCGCAACTC -3'

Név: Cp S1 pAct EV Sal frw

Oligonukleotid (46-mer):

5'- TTTTGTGATATCGTCGACCAGTTTCAATTCTCACTCAATTCTCAC -3'

Név: Cp S1 tGal Sma Sal rev

Oligonukleotid (39-mer):

5'- TTTTTCCTCCGGGTCGACTTCTTGCCACTTTCGCAACTC -3'

Név: Cp S3 pAct EV BamH frw

Oligonukleotid (46-mer):

5'- TTTTTTTGATATCGGATCCCAGTTTCAATTCTCACTCAATTCTCAC -3'

Név: Cp S3 tGal Sma SacII Xho rev

Oligonukleotid (45-mer):

5'- TTTTTTCCCGGGCCGCGGCTCGAGTTC TTGCCACTTTCGCAACTC -3'

Név: ReTi Cp lip2 frw

Oligonukleotid (22-mer):

5'- GCAAATGGACCACTATCAACAG -3'

Név: ReTi Cp lip2 rev

Oligonukleotid (23-mer):

5'- GAGTAAAACTTGCTTGGTGCTG -3'

Név: ReTi Cp Tub4 frw

Oligonukleotid (22-mer):

5'- GAACACTTATGCCGAGGACAAC -3'

Név: ReTi Cp Tub4 rev

Oligonukleotid (22-mer):

5'- ACTCTCACCCTGACTCCTTGC -3'

4.7.2 A PCR reakcióelegy összetétele 50 µl végtérfogatra:

- 50 pmol/µl forward primer
- 50 pmol/µl reverse primer
- 100-500 ng templát DNS
- DNS- polimeráz (*PfuUltra*® II Fusion HS DNA Polymerase - Stratagene)
- puffer
- 1 mM dNTP-mix
- steril desztillált víz

4.7.3 A polimeráz láncreakció során alkalmazott reakciókörülmények:

- 95 °C, 1 perc denaturáció
- 34 x 94 °C 30 sec denaturáció, 58 °C 15 sec annealing, 45 sec elongáció (termék mérettől függően változik)
- 72 °C, 7 perc utópolimerizáció

4.7.4 Az RT-PCR összetétele 20 µl végtérfogatra:

- 10 µl Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix reakció puffer (2x) (Fermentas)
- 2 µl 3-3 µmol forward-reverse primer keverékből
- 1,5 µl cDNS minta
- 6,5 µl nukleáz mentes bidesztillált víz

4.7.5 Az RT-PCR során alkalmazott reakciókörülmények:

- 94 °C, 3 perc denaturáció
- 40 x 94 °C 15 sec denaturáció, 60 °C 1 perc annealing és elongáció
- 65 °C 5 sec, utópolimerizáció
- 95 °C, melting point meghatározása

4.8 Lipáz aktivitás mérés fluoriméteres módszerrel (FluoStarOptima készülék BMG labtech)

Reakcióelegy:

- 50 mM Tris
- 60 µmol 4-metilumbelliferil-oleát

Excitációs filter: 360BP1

Emissziós filter: 460-10

Fotoelektron sokszorozó: 550

4.9 DNS gélelektroforézis

A PCR során létrejött amplikonok 1-1 µl-ét 0,8%-os, etídium-bromiddal festett agaróz gélen futtattuk meg Bio-Rad horizontális gélelektroforézis készülékkel. A géleket ultraibolya fényel megvilágítva vizsgáltuk és fényképeztük le UVP készülékkel.

4.10 A PCR termékek tisztítása

A PCR termékek tisztítását Gel/PCR Fragments Extraction KIT (Geneaid) segítségével végeztük, a gyártó instrukciói alapján. A termékek koncentrációját DNS gélelektroforézissel ellenőriztük.

4.11 A vektor defoszforilálása

Az autoligálás elkerülése érdekében a megfelelő restrikciós enzimekkel (Fermentas) hasított vektort CIAP-al (alkalikus foszfátáz) (Fermentas) először 37°C-on 25 percig, majd 85°C-on 10 percig inkubáltuk. A terméket a Gel/PCR Fragments Extraction KIT (Geneaid) felhasználásával tisztítottuk meg.

4.12 Tisztított PCR termékek preparatív futtatása és vektorba ligálásuk

A tisztított PCR-termékeket preparatíván emésztettük, megfuttattuk, majd a megfelelő méretű DNS-fragmentumot tartalmazó gélrészletet steril szikével kivágtuk. A géldarabkából a DNS-t a Gel/ PCR Fragments Extraction KIT (Geneaid) segítségével izoláltuk vissza. Ezt követően a tisztított PCR termékeket pBluescript II SK vektorhoz mértük. 65°C, 5 perc vízfürdőt követően a mintákat rögtön jégre helyeztük, majd a csövekbe 10x ligáz puffert és ligáz (Fermentas) enzimet pipettáztunk. 20°C-on overnight inkubáltunk. A termékek koncentrációját DNS gélelektroforézissel állapítottuk meg.

4.13 *E. coli* sejtek transzformálása

Szuperkompetens *E. coli* XL1-Blue sejteket jégen kiolvasztottuk. A ligálási elegyet (7,5 µl) a kiolvasztott kompetens sejtet tartalmazó Eppendorf csőbe pipettáztuk, majd szuszpendáltuk és 25 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 2 perc 42°C-os hő sokkot alkalmaztunk, majd a mintákat azonnal jégen hűtöttük. 800-800 µl LB oldatot mértünk a mintákra és 45 percig 37°C-on inkubáltunk. Az inkubáció letelte után 50 µl térfogat transzformánst ampicillines LB-táptalajra szélesztettünk. A maradék sejtet 5000 rpm 5 perces centrifugálással összegyűjtöttük, a felülúszót kiöntöttük. A visszamaradt folyadékban felfuszpendált sejteket ampicillines LB-táptalajra szélesztettük. A sejteket egy napig 37°C-on inkubáltuk.

4.14 Plazmid DNS izolálás: „MiniPrep-ek” készítése

A transzformált *E. coli* XL1-Blue egyedi kolóniák sejtjeit 37°C-on egy éjszakán át tenyésztettük 2 ml, ampicillinnel kiegészített LB tápoldatban. A tenyészetet Eppendorf

csövekbe mértük és a sejteket 5000 rpm 5 perces centrifugálással ülepitettük. A fellazított pelletez 100 µl GET oldatot pipettáztunk, majd homogénre vortexeltük. Ezt követően 200 µl alkalikus SDS-sel feltártuk a sejteket. Az Eppendorf csöveket a folyadék feltisztulásáig óvatosan fejfel-lefele mozdítással elegyítettük. Ezután 150 µl High Salt oldatot juttattunk a csövekbe, melyeket ismét fejfel-lefele mozdítással elegyítettük a "kromoszómális" DNS kicsapódása következtében keletkezett fehér csapadék megjelenéséig. 10 perc 13000 rpm-en végzett centrifugálás után a felülúszót új Eppendorf csövekbe pipettáztuk. 1:1 arányban kloroform-izoamilalkohol (24:1) oldatot adtunk hozzá, melyet újabb 10 perc 13000 rpm-es centrifugálás követett. A centrifugálás után a minták felső, vizes fázisát újonnan előkészített Eppendorf csövekbe pipettáztuk. A felülúszóhoz megegyező mennyiségű izopropanolt mértünk, amivel a plazmid DNS-t kicsaptuk. Ezt követően a mintákat 1 óráig -20°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten melegedni hagytuk, majd 10 perc 13000 rpm-en végzett centrifugálás következett. Az izopropanol eltávolítása után 70%-os etanollal mostuk a pelletet, majd 10 percig 13000 rpm-en centrifugáltunk. Az etanolos mosást követően leszívtuk az alkoholt, és a pelletet nyitott tetővel szobahőmérsékleten szárítottuk. A beszárított mintákat 50 µl RN-áz tartalmú desztillált vízben (10 µg/ml RN-áz) vettük fel, majd a megfelelő restrikciós enzimekkel történő 1,5 órás emésztést követően, 0,8%-os agaróz gélen ellenőrző futtatást végeztünk.

4.15 Plazmid DNS izolálás: „MaxiPrep-ek” készítése

A MaxiPrep-ek készítéséhez 100 ml transzformáns *E. coli* XL1-Blue sejtet 37°C-on, ampicillinnel kiegészített tápoldatban egy éjszakán át tenyésztettük. A plazmid DNS kivonást Viogene Maxi plazmid tisztító kit segítségével végeztük. A tenyészetet 50 ml-es falcon csövekbe osztottuk szét, és 3000 rpm 20 perces centrifugálással összegyűjtöttük a sejteket. A felülúszót leöntöttük, majd a pelletet 4 ml VP1 pufferrel felfuszpendáltuk, és SS34-es Sorvall centrifuga csőbe öntöttük át. Ezután 4 ml VP2 puffert pipettáztunk a csövekbe, az elegyet óvatosan összekevertük, és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. 4 ml VP3 puffert adtunk a folyadékhoz, óvatosan kevertük, majd 4°C-ra előhűtött Sorvall centrifugában 13000 rpm mellett 10 percig centrifugáltunk. A felülúszót steril gézen keresztül az előzőleg előkészített oszlopra (először 3 ml 96%-os etanollal, majd 10 ml VP1 pufferrel mosott) mértük. A plazmid preparátum átfolyását követően az oszlopra kötött DNS-t 15 ml VP5 pufferrel mostuk, ezután pedig egy tiszta 50 ml-es falcon csőbe helyezve az oszlopot 5 ml VP6 pufferrel eluáltuk a DNS-t. A falcon cső tartalmát 1 ml-enként 5 db 2 ml-es Eppendorf csőbe adagoltuk szét, melyekre egyenként 750 µl izopropanolt pipettáztunk a DNS

kicsapásához. A csöveket 30 percig -20°C-on inkubáltuk. A mintákat ezt követően 10 percig szobahőmérsékleten melegedni hagytuk, majd 13000 rpm mellett 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, a pelletet pedig 70%-os etanollal mostuk 13000 rpm 10 perces centrifugálással, majd a mintákat beszárítottuk. Az 5 Eppendorf csőben lévő mintát 150 µl desztillált vízzel egy csőbe gyűjtöttük össze.

A maxi plazmid preparátumokat ellenőrzésként megfelelő restriktációs enzimekkel történő emésztést követően, 0,8%-os agaróz gélen futtattuk meg.

4.16 *C. parapsilosis* kompetens sejtek készítése

100 ml YPD tápoldatban *C. parapsilosis* sejteket tenyésztettünk 30°C-on egy éjszakán át. A tenyészetet 2db 50 ml-es falcon csőbe adagoltuk. 4°C-ra előhűtött centrifugában 3000 rpm mellett 5 perces centrifugálással a sejteket összegyűjtöttük, majd 50 ml TE oldattal mostuk. Újabb 3000 rpm 5 perces centrifugálás után a sejt pelletet 30 ml TE-lítium-acetát oldatban vettük fel, és 45 percig 30°C-on ráztuk. Az inkubációs idő letelte után 750 µl 1 M dithiotreitol (DTT) mértünk a csőbe, majd 30°C-on 15 perces rázás következett. Ezután jéghideg desztillált vízzel 50 ml-re kiegészítettük és 4°C-on 3000 rpm 5 percig centrifugáltuk, majd ismételt centrifugálás mellett jéghideg desztillált vízzel kétszer mostuk a mintánkat. A pelletet 30 ml 1 M szorbitol oldatban vettük fel, majd ismét centrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc, 4°C). A felülúszót leöntöttük, és a visszamaradó folyadékban felfuszpendáltuk a sejteket. A sejteket felhasználásig jégen tartottuk.

4.17 *Candida* sejtek transzformációja

Eppendorf csőben összekevertük a 40 µl kompetens *C. parapsilosis* sejtet a transzformálni kívánt 5 µg -nyi DNS fragmentummal, melyet ezt követően azonnal jégre tettünk, majd 2 cm részméretű előhűtött elektroporátor küvettába (BioRad) pipettáztunk, és BioRad elektroporátor Sch2 programmal (1,5 KV, 25 microF, 200 ohm) elektromos ívet húztunk. Az elektroporáció után a mintához azonnal 800 µl jéghideg YPD+1 M Sorbitol tápoldatot adtunk. A sejteket szuszpendáltuk és 5 percig jégen tartottuk. Ezt követően a küvetták tartalmát 2 ml YPD+1 M szorbitol tápoldatot tartalmazó csövekbe pipettáztuk. A csöveket 3 órán át, rázás nélkül 30°C-on inkubáltuk. Az inkubáció letelte után 100 µl mintát NAT-tal kiegészített YPD táptalajra szélesztettük. A maradékot 5000 rpm 5 perces centrifugálással összegyűjtöttük, és a visszamaradó oldatban felfuszpendált sejteket is kiszélesztettük. A csészéket 30°C-on inkubáltuk.

4.18 RNS izolálás

C. parapsilosis transzformáns és vad típusú GA1 telepeket 2 ml YPD tápoldatba oltottuk. A tenyészetet 30°C-on 2 napig rázattuk, majd kb. 12 órán át 10 ml, 2% olívaolajat tartalmazó 1xYNB tápoldatban indukáltuk (transzformánsok esetén a tápoldatot NAT-tal is kiegészítettük). A sejteket 30°C, 3000 rpm, 20 perces centrifugálással összegyűjtöttük. A felülúszóból 1 ml-t lipáz aktivitás mérésre félretettünk, a többit leöntöttük. 1x PBS-el történő mosás után a sejtekből NucleoSpin RNA Plant izoláló kit (Macherey-Nagel) segítségével tisztítottunk totál RNS-t a gyártó előírásainak megfelelően, apró módosításokkal. A módosítás a következő volt. Amikor a sejtekhez hozzáadtuk a 400 µl RA1 (lízis) puffert, akkor kevés 1 mm átmérőjű RNáz mentes üveggyöngyöt (Sigma) adagoltunk a sejtekhez. Az elegyet 4 percig automata vortexen rázattuk a sejtek hatékony feltárásáért. A továbbiakban a Macherey-Nagel gyártó által meghatározott módon jártunk el.

4.19 cDNS írás

A cDNS írás a RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Scientific) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint történt. A kiindulási reakcióelegybe 200 ng RNS-t vittünk be. A reverz transzkripcióhoz oligo dT primert használtunk, majd az átírást követően a reakcióelegyet ötszörösére hígítottuk, amiből 1,5 µl-t RT- qPCR reakcióba mértünk.

4.20 RT-PCR

Az mRNS mérést C1000Thermal Cycler és CFX96Real Time System (BioRad) kombinált készülékkel kiviteleztek. 1 cDNS mintából 3 technikai párhuzamos mintát készítettünk. Méréseinket a $\Delta/\Delta C_t$ módszerrel végeztük, ahol a Tub4 gént használtuk belső kontrollnak.

4.21 Totál DNS kivonás "plazmid rescue"-hoz

C. parapsilosis transzformáns és vad típusú GA1 telepeket 2 ml YPD tápoldatba oltottunk. A tenyészetet 30°C-on 2 napig növesztettük, majd Eppendorf csövekbe adagoltuk, és a sejteket üleptítettük (5000 rpm, 5 perc). A sejtekhez a felülúszó eltávolítása után 500 µl lízis puffert pipettáztunk. Az így kapott szuszpenziót 1 mm átmérőjű üveggyönggyel (Sigma) 1 ml-re egészítettük ki. 3 perc vortexelés után 275 µl 7 M ammónium-acetátot adtunk hozzá, majd 5 percre 65°C-os vízfürdőbe helyeztük. A hőkezelést követően a mintát 5 percig jégen inkubáltuk, majd 500 µl kloroform:izoamilalkohol (24:1) mértünk az elegyhez, vortexeltük,

és 13000 rpm mellett 10 percig centrifugáltuk. A felső vizes fázisból kb. 1 ml-t új Eppendorf csőbe pipettáztunk, amit azonos térfogatú izopropanollal egészítettünk ki és 10 percig jégen inkubáltuk. Centrifugálás után (13000 rpm 10 perc) az alkoholt eltávolítottuk, a pelletet pedig 70% etanollal (500 µl) mostuk. Újabb centrifugálás után a kapott pelletet beszárítottuk és 100 µl RN-áz tartalmazó desztillált vízben (10 µg/ml RNáz) vettük fel. A kivont DNS minta koncentrációjának ellenőrzéséhez 1-1 µl mintát 0,8%-os agaróz gélen futtattunk meg.

4.22 Lipáz aktivitás mérés

4.22.1 Fluoriméteres módszer

100 µl reakcióelegyeket (anyagok és módszerek 4.8 pont) 96 főröhelyes mikrotiter lapba pipettáztunk, majd az RNS izolálás során felretett 1 ml fermentléből 50 µl-t adtunk a mintákhoz. Az elegyet 37°C-on inkubáltuk. A FluoStarOptima készülékkel végzett méréshez (BMG labtech) 0 időpontban és 20 perc múlva mintát vettünk.

Bradford reakció alkalmazásával lemértük a fermentlevek fehérje koncentrációját. A fermentlevek lipáz tartalmára a következő összefüggés alapján következtethetünk:

(20 perces érték - 0 perces érték)/ fehérje koncentráció → lipáz aktivitás → lipáz tartalom

4.22.2 Rhodaminos táptalajra oltás

Az RNS izolálás során használt transzformáns telepeket Rhodamin-B-vel kiegészített YNB-olívaolaj táptalajra oltottuk. A táptalajban lévő egyetlen szénforrás, az olívaolaj lipáz általi lebontása során glicerint és zsírsavakat keletkeztet. A szabad zsírsavak a rhodamin-B-vel komplexet képeznek, melyet sötétrózsaszín gyűrűként detektálhatunk a lipáz termelő telepek körül.

4.23 Statisztikai mérési módszer szignifikancia megállapítására

A mérési eredmények között fennálló szignifikancia megítélésére Newman-Keuls tesztet, illetve ANOVA-t használtunk az adatoktól függően a "GraphPad Prism version 5.02 for Windows (California, USA)" program alkalmazásával.

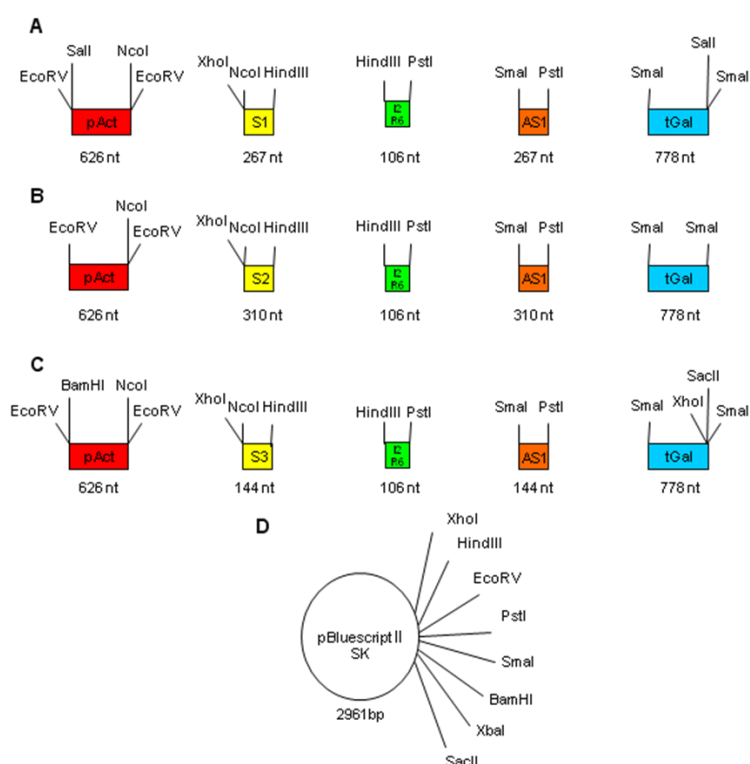
5. Eredmények és értékelés

5.1 A *LIP2* gén csendesítése céljából 3 különböző *LIP2* mRNS szakaszt célzó konstrukciók megtervezése és elkészítése:

5.1.1. Alapelgondolás ismertetése és a csendesítő konstrukciók építőelemeinek bemutatása

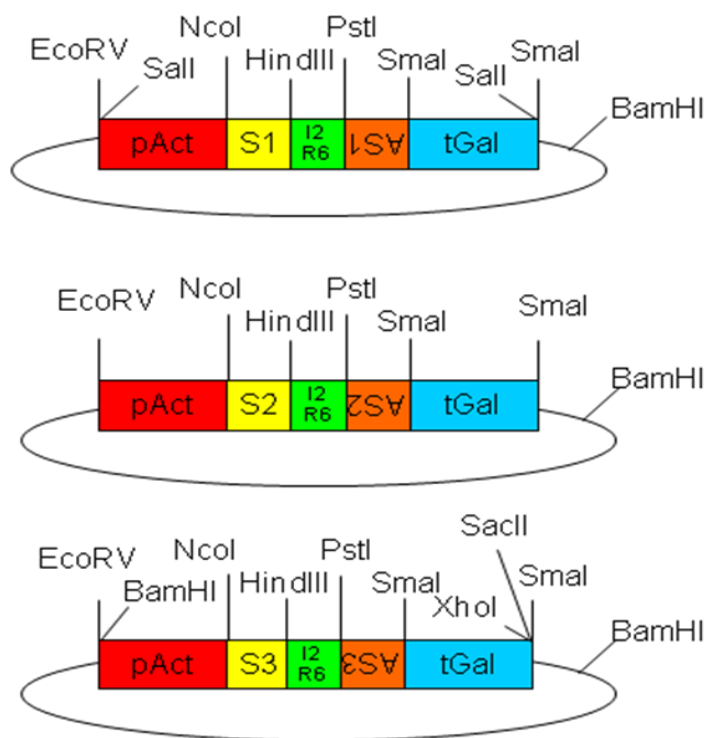
Munkánk kezdeti lépéseként megterveztük a *LIP2* mRNS 3 különböző szakaszát célzó konstrukciókat (S1Si, S2Si és S3Si). Az S1Si és S2Si a mRNS ORF régiójának két nem átfedő szakaszát, az S3Si pedig a mRNS 3'UTR régióját targetálja. A sense és az antisense szekvenciák közé egy másodlagos szerkezet felvételét könnyítő szekvencia klónozását terveztük el, amely a *C. albicans* *RAD6* gén második intronja volt. Ahhoz, hogy kifejeztessük a kettősszállú RNS-t formáló konstrukciót, a *C. parapsilosis* aktin promóterét és a galaktozidáz génről átíródó 3' terminális régiót terveztük beépíteni az expressziós kazettákba.

Az 1. ábrán mutatjuk be azokat az építőelemeket, amelyekből az S1Si, S2Si és S3Si expressziós kazettákat összeállítottuk (2. ábra). Bizonyos építőelemek 5' és 3' végeire olyan restriktós endonukleáz felismerő motívumokat is beépítettünk, ami majd a közeljövőben tervezett munkánk során azt a célt szolgálják, hogy az S1Si, S2Si és S3Si konstrukciók egyetlen transzformáló vektorba összekombinálhatóak legyenek.



1. ábra: S1Si, S2Si és S3Si expressziós kazetták építő elemei

A: S1Si expressziós kazetták építő elemei, **B:** S2Si expressziós kazetták építő elemei, **C:** S3Si expressziós kazetták építő elemei. **D:** pBluescript II SK vektor (pSK) multiklónozó helyének leegyszerűsített ábrázolása. Piros: *C. parapsilosis* aktin gén promóter régiója (pAct); narancssárga: *LIP2* mRNS-t targetáló sense régiók (S1 és S2 ORF régiót targetál, az S3 pedig a mRNS 3'-UTR régióját); zöld: *C. albicans* *RAD6* gén második intronja (i2R6, későbbiekben R6); citromsárga: *LIP2* mRNS-t targetáló antisense régiók (AS1, AS2, AS3); kék: *C. parapsilosis* galaktozidáz gén terminális régió (tGal)



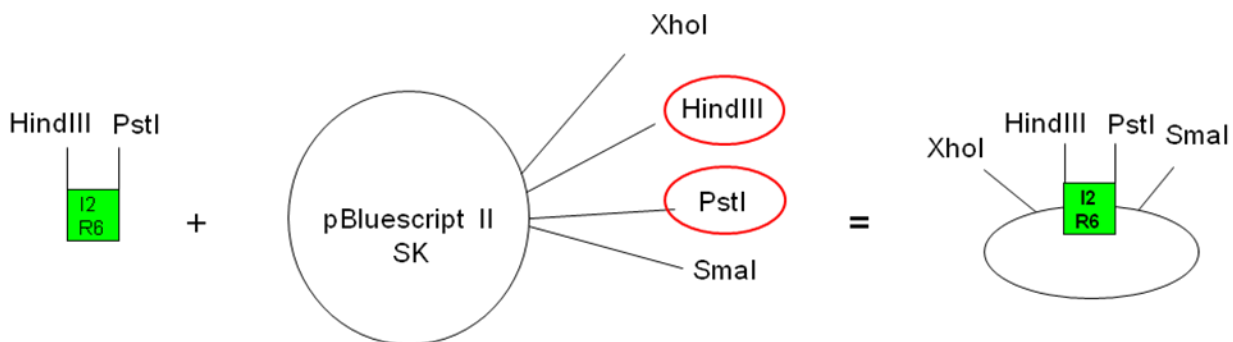
2. ábra: S1Si, S2Si és S3Si expressziós kazetták terveinek bemutatása

A: S1Si expressziós kazetta, B: S2Si expressziós kazetta, C: S3Si expressziós kazetta terve

5.1.2. A konstrukcióépítés kivitelezése

Az antisense régiók sense régiókkal való egy molekulában való kifejeztetésére inverted klónozást alkalmaztunk. A három konstrukció elemeit egymás után történő klónozási lépéseken keresztül szereltük össze pBluescript II -SK (pSK) vektorba.

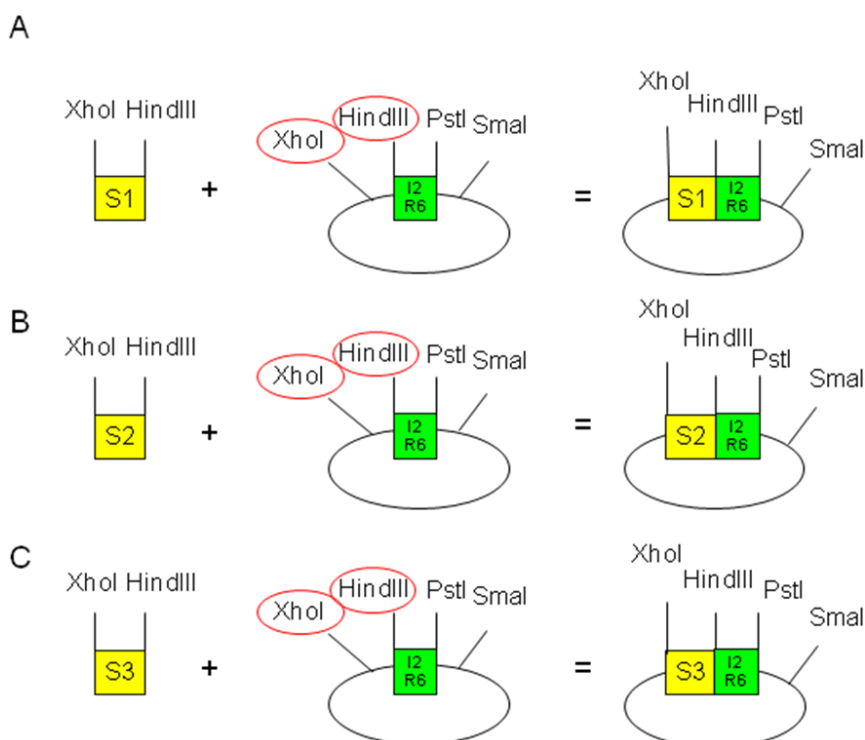
Először a *C. albicans* *RAD6* gén második intronját (i2R6) klónoztuk be pSK vektorba *HindIII*-*PstI* helyre, létrehozva ezzel a pSK+R6 részkonstrukciót (3. ábra)



3. ábra: A pSK+R6 részkonstrukció építésének ábrázolása

Az *i2R6* intron pSK *HindIII*-*PstI* helyre történő klónozásával létrejött a pSK+R6 részkonstrukció.

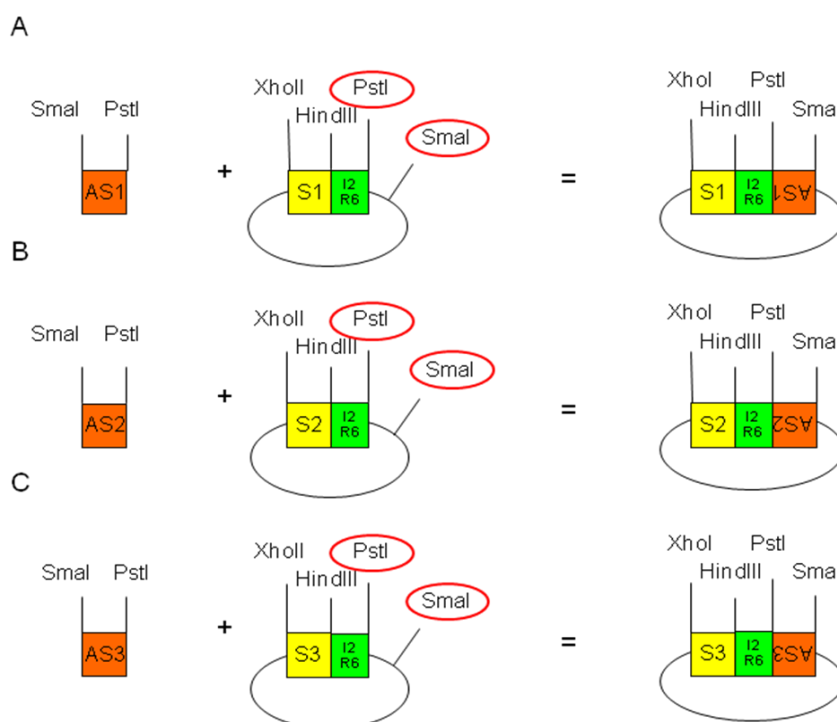
Ezt kiindulási építőelemként használtuk fel a következő klónozási lépésben mind a három konstrukció esetén. A pSK+R6 részkonstrukcióba az S1, S2 és S3, sense építőelemeket *XhoI*-*HindIII* klónozással építettük be, létrehozva ezzel a pSK+S1+R6, pSK+S2+R6 és pSK+S3+R6 részkonstrukciókat, amelyeket kiindulási építőelemként használtunk fel az antisense elemek beépítéséhez (4. ábra).



4. ábra: A pSK+S1+R6, pSK+S2+R6 és pSK+S3+R6 részkonstrukciók építése

A: pSK+S1+R6, **B:** pSK+S2+R6, **C:** pSK+S3+R6 részkonstrukciók építése pSK+R6 részelem, valamint S1, S2, illetve S3 sense elemek *XhoI*-*HindIII* klónozásával

Az antisense elemek ugyanazon templátról lettek felszaporítva, mint a sense elemek, tehát a sense és az antisense PCR termékek szekvenciája azonos volt. A forward és reverse primerek 5' végére tervezett restriktáz endonukleáz felismerő motívumok által a sense szálhoz viszonyítva fordított irányú beépülést értünk el a pSK vektorba klónozáskor. Az AS1, AS2 és AS3 antisense elemeket pSK+S1+R6, pSK+S2+R6 és pSK+S3+R6 részkonstrukciókba *Pst*I-*Sma*I helyre klónoztuk, létrehozva ezzel a pSK+S1+R6+AS1, pSK+S2+R6+AS2 és pSK+S3+R6+AS3 részkonstrukciókat (5. ábra).

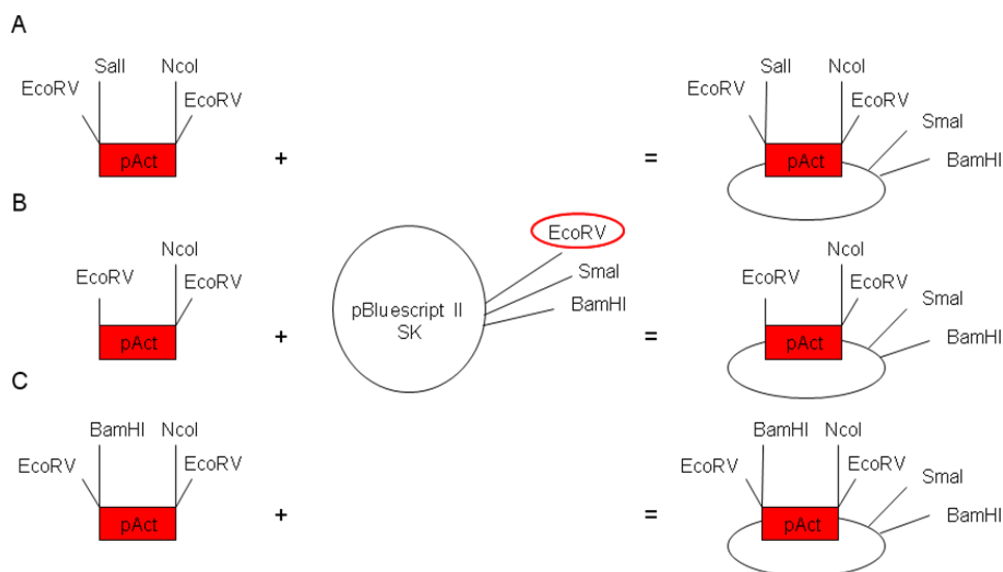


5. ábra: A pSK+S1+R6+AS1, pSK+S2+R6+ AS2 és pSK+S3+R6+ AS3 részkonstrukciók építésének bemutatása

A: pSK+S1+R6+AS1, **B:** pSK+S2+R6+AS2, **C:** pSK+S3+R6+AS3 részkonstrukciók építése az AS1 (A), AS2 (B) és AS3 (C) elemek pSK+S1+R6 (A), pSK+S2+R6 (B), pSK+S3+R6 (C) részkonstrukciókba történő *Pst*I-*Sma*I klónozásával

Ezt követően mind a három részkonstrukció részére expressziós kazettát készítettünk a hozzájuk tervezett pAct (aktin promóter) és tGal (galaktozidáz terminális régió) szekvenciák klónozásával. Az 1. ábrában bemutatott építőelemeknél látszik, hogy a pAct és tGal elemek 5', illetve 3' végeire másodlagos és harmadlagos klónozó motívumokat építettünk, amelyek nem a jelenlegi pályamunkában bemutatott konstrukcióépítésnél játszanak szerepet, hanem a közeljövőben tervezett kombinált konstrukcióépítés céljait szolgálják.

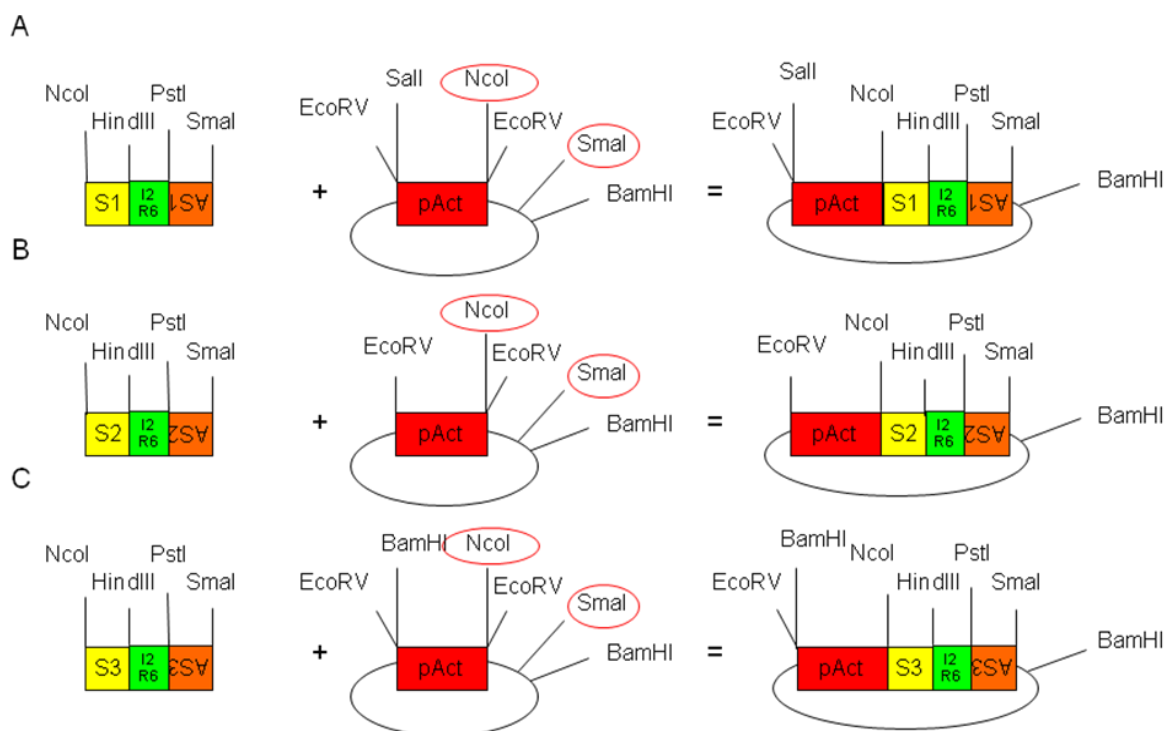
A pAct szekvenciákat *EcoRV* klónozással juttattuk be pSK vektorba, létrehozva a pSK+pAct részekonstruksiókat (6. ábra).



6. ábra: A pSK+pAct részekonstruksiók építésének bemutatása

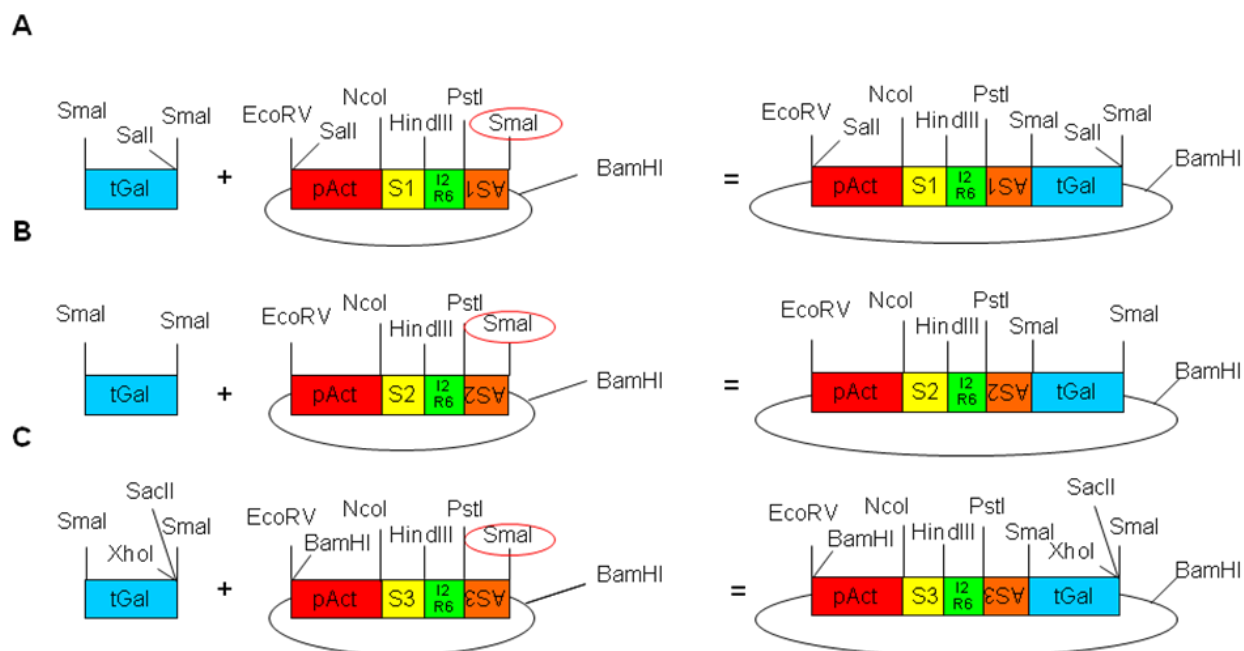
pSK+pAct részekonstruksiók építése az **A:** S1+R6+AS1, **B:** S2+R6+AS2 és **C:** S3+R6+AS3 részekonstruksiók részére *EcoRV* klónozással

A pSK+pAct részekonstruksiókba *NcoI-SmaI* helyre klónoztuk S1+R6+AS1, S2+R6+AS2 és S3+R6+AS3 részekonstruksiókat (7. ábra), majd a tGal elemeket építettük be *SmaI* klónozással *SmaI* emésztett defoszforilált vektorba (8. ábra). A tGal klónozás esetén a beépülés orientációjának ellenőrzését követően S1Si (pSK+pAct+S1+R6+AS1+tGal), S2Si (pSK+pAct+S2+R6+AS2+tGal) és S3Si (pSK+pAct+S3+R6+AS3+tGal) expressziós kazettákat hoztunk létre.



7. ábra: A pSK+pAct+S1+R6+AS1, pSK+pAct+S2+R6+AS2 és pSK+pAct+S3+R6+AS3 részkonstrukciók építésének bemutatása

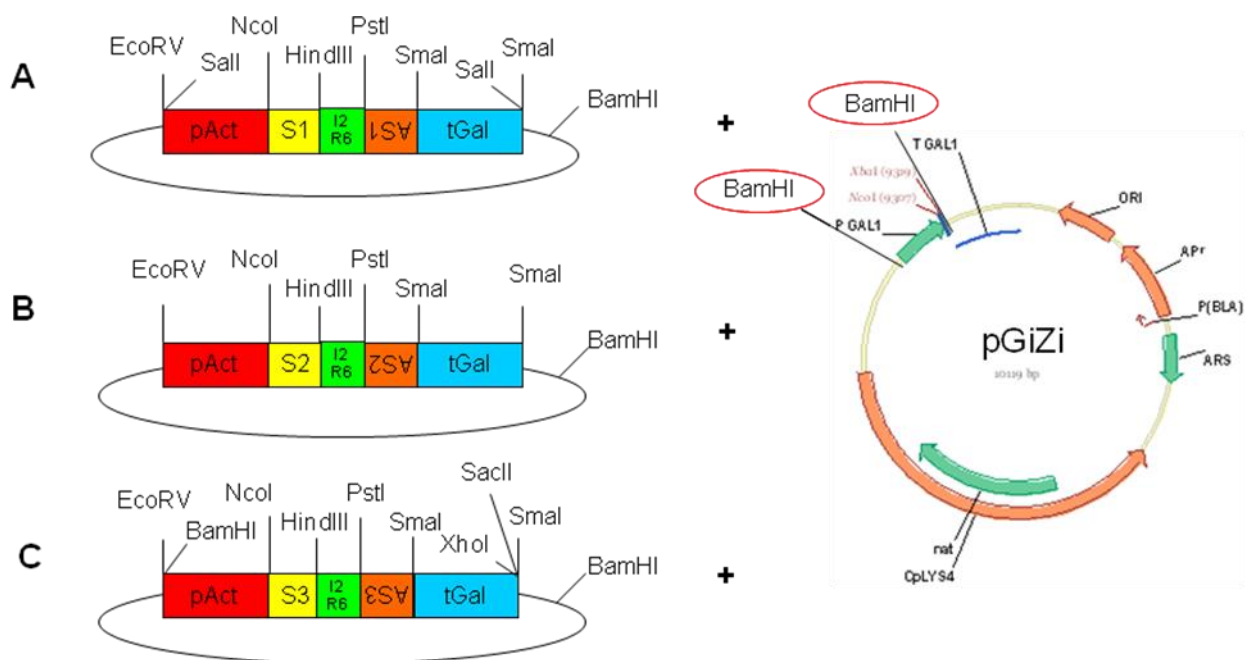
A: pSK+pAct+S1+R6+AS1, **B:** pSK+pAct+S2+R6+AS2, **C:** pSK+pAct+S3+R6+AS3 részkonstrukciók építése
A pSK+pAct+S1+R6+AS1 (A), pSK+pAct+S2+R6+AS2 (B) és pSK+pAct+S3+R6+AS3 (C) részkonstrukciók pAct elembe történő NcoI-SmaI klónozásával



8. ábra: Az S1Si, S2Si és S3Si expressziós kazetta építésének bemutatása

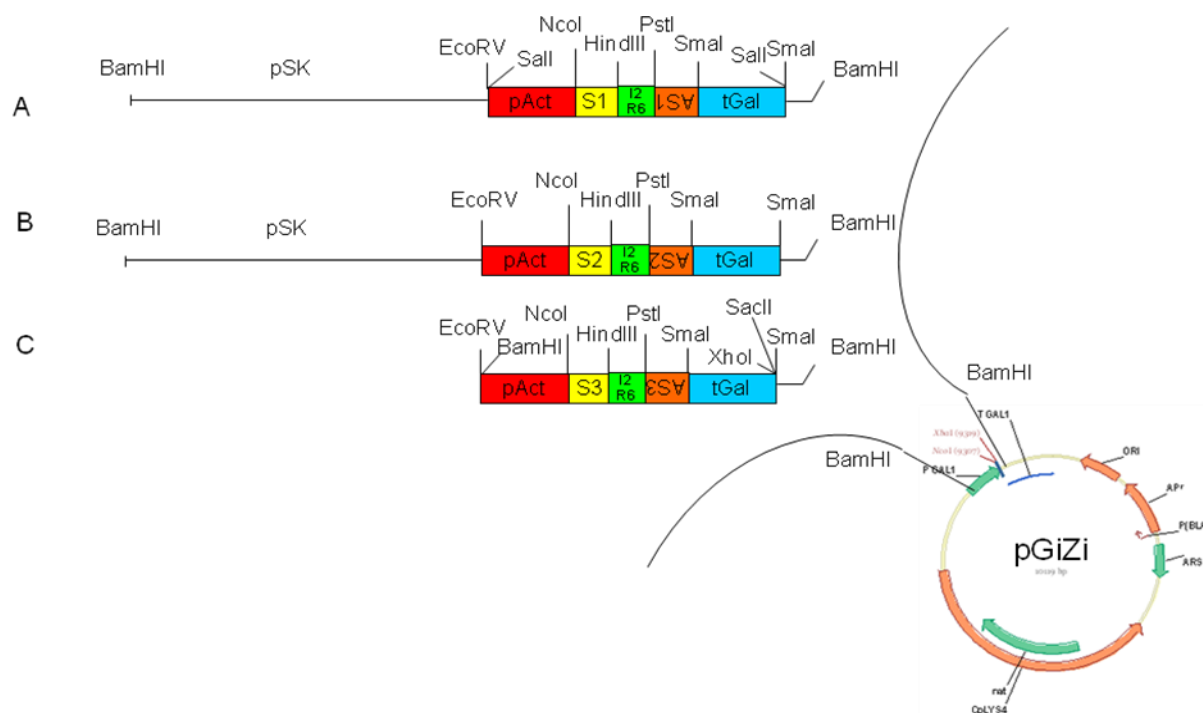
A: S1Si, **B:** S2Si, **C:** S3Si expressziós konstrukciók építése a tGal elem pSK+pAct+S1+R6+AS1 (A), pSK+pAct+S2+R6+AS2 (B) és pSK+pAct+S3+R6+AS3 (C) részkonstrukciókba történő *Sma*I klónozásával.

Ezt követően az S1Si, S2Si és S3Si expressziós kazettákat *Bam*HI klónozással átklónoztuk *Bam*HI emésztett defoszforilált pGiZi vektorba (Hamari és mtsi, közlés alatt), amely *C. parapsilosis* autonóm replikációs szekvenciát (ARS), és nourseotrichin (NAT) antibiotikum rezisztenciát biztosító *CaSAT1* szelektációs marker gént tartalmaz (9. ábra).



9. ábra I: Az S1Si, S2Si és S3Si expressziós kazetták átklónozásának bemutatása pGiZi vektorba

A: pGiZi-S1Si, **B:** pGiZi-S2Si, **C:** pGiZi-S3Si expressziós konstrukciók építése az S1Si, S2Si és S3Si expressziós konstrukciók *Bam*HI klónozásával pGiZi vektorba.

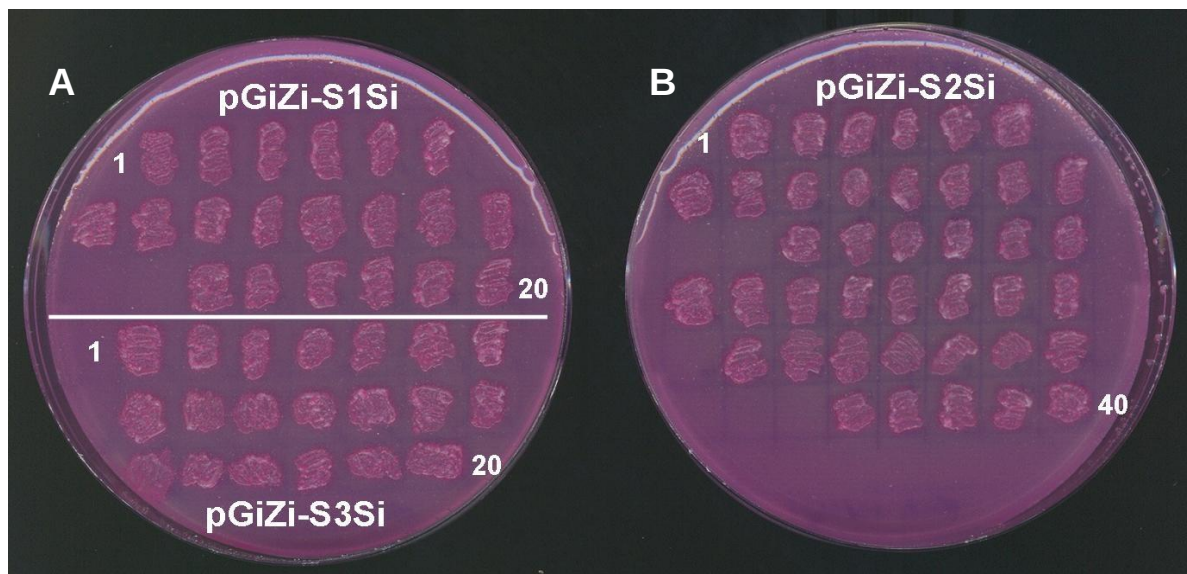


9. ábra II.: Az S1Si, S2Si és S3Si expressziós kazetták átklózásának bemutatása pGiZi vektorba

A: pGiZi-S1Si, **B:** pGiZi-S2Si, **C:** pGiZi-S3Si expressziós konstrukciók építése az S1Si, S2Si és S3Si expressziós konstrukciók BamHI klónozásával pGiZi vektorba.

5.2. A pGiZi-S1Si, -S2Si és -S3Si konstrukciók, valamint pGiZi vektor bejuttatása C. parapsilosis GA1 vad típusú törzsbe

A pGiZi-S1Si, -S2Si és -S3Si konstrukciókból maxi plazmid preparátumot készítettünk, és a konstrukciókat transzformációval bejuttattuk *C. parapsilosis* GA1 törzsbe. Kontrollként elvégeztük az üres pGiZi vektor transzformálását is. A transzformációt követően YPD+NAT szelektív táptalajon rezisztens transzformánsokat kaptunk. Minden pGiZi-Si transzformálásból legalább 20-20 telepet gyűjtöttünk le YPD "master plate"-ekre. A master plate-ekről a telepeket YNB+olívaolaj+rhodamin-B+NAT táptalajokra is áttöltöttük, abból a célból, hogy lehetőségünk legyen szignifikáns *LIP2* csendesítés esetén a lipáz enzimaktivitás hiányának vagy lecsökkenésének az észlelésére (10. ábra). A transzformáns telepekből 2-2 telep esetén "plazmid-rescue"-t hajtottunk végre totál DNS *E. coli* XL1-Blue sejtekbe történő transzformálásával. Minden esetben sikerült visszanyernünk a pGiZi-Si konstrukciókat, amely bizonyítja, hogy a transzformánsok valóban hordozzák az Si-konstrukciókat.



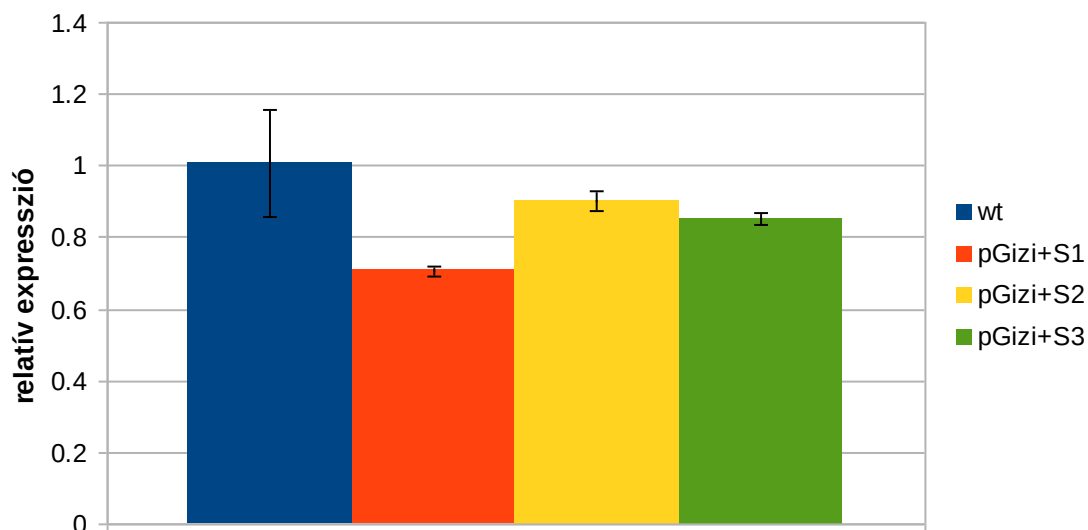
10. ábra: A pGiZi-S1Si, pGiZi-S2Si és pGiZi-S3Si expressziós konstrukciókat hordozó *C. parapsilosis* GA1 transzformánsok növekedési tesztje YPD+olívaolaj+rhodamin-B+NAT táptalajokon

A: pGiZi-S1Si (1-20) és pGiZi-S3Si (21-40) transzformánsok növekedési tesztje YPD+olívaolaj+rhodamin-B+NAT táptalajon, **B:** pGiZi-S2Si (1-40) transzformánsok növekedési tesztje YPD+olívaolaj+rhodamin-B+NAT táptalajon. A lipáz aktivitás jelenlétére a telepek és az őket körülvevő táptalaj erős rózsaszínre színeződése utal.

5.3. RNS kivonás, cDNS írás és kvantitatív Real-Time PCR (qRT-PCR) végrehajtása az Si-konstrukciókat hordozó törzsekből, valamint az üres pGiZi vektort hordozó kontroll törzsből

RNS kivonáshoz a pGiZi-S1Si, -S2Si és -S3Si konstrukciókat, valamint az üres pGiZi vektort hordozó ("plazmid-rescue-val") ellenőrzött 2-2 transzformánst a *LIP2* gén kifejeződését biztosító induktív körülmények között neveltük fel. A tenyészetek felét felretettük lipáz enzimaktivitás mérés céljából, a maradékból pedig RNS kivonást követően cDNS-t írtunk, majd a *TUB4* és *LIP2* génekre specifikusan qRT-PCR-t végeztünk. Minden minta esetén 3-3 technikai párhuzamos PCR reakciót mértünk össze. A qRT-PCR analízist a $\Delta/\Delta C_t$ módszer alkalmazásával végeztük el. Ennek során az adatokat a *TUB4* belső kontroll génre normalizáltuk, és az így nyert adatokat az üres pGiZi-t hordozó kontroll minta eredményeire vonatkoztattuk. Az eredményeket a 11.A ábra mutatja. Az S1Si, S2Si és S3Si konstrukciókat hordozó törzsekben a *LIP2*-mRNS szintje nem tért el szignifikáns mértékben ($p \leq 0,05$) az üres pGiZi vektort hordozó vad típusú kontroll törzsben mért szinttől.

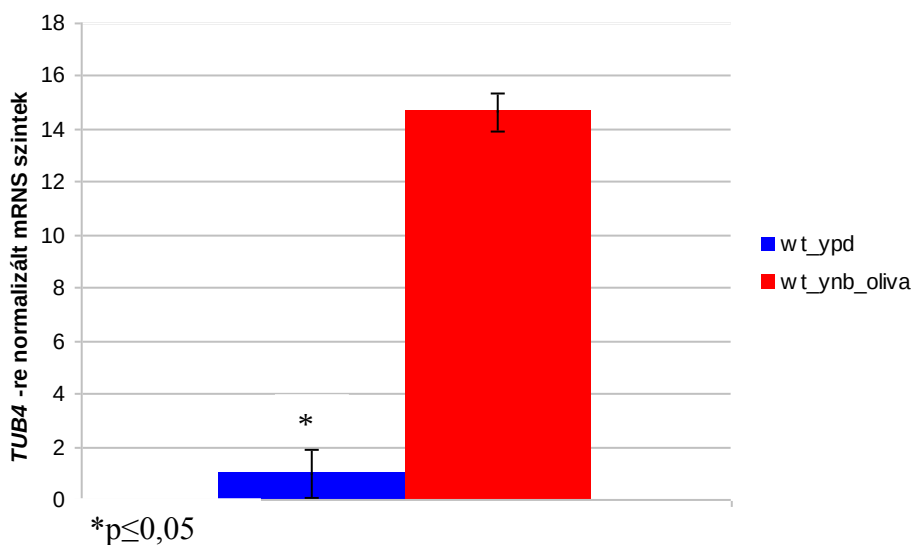
A *LIP2* relatív kifejeződése



11. A ábra: A pGizi-S1Si, pGizi-S2Si, pGizi-S3Si és üres pGizi expressziós konstrukciókat hordozó *C. parapsilosis* GA1 transzformánsok *LIP2* gén relatív mRNS szintjének bemutatása qRT-PCR eredmények alapján

Elvégeztük az üres pGizi-t hordozó vad típusú törzs indukálhatóságát bizonyító ellenőrző qRT-PCR-t is (11. B ábra), ahol figyeltük a *LIP2* gén kifejeződését YPD+NAT, illetve YNB+NAT+olívaolaj tápoldatokban. Az eredmény alapján láthattuk, hogy a *LIP1* gén expressziója olívaolaj jelenlétében erősen indukálódik.

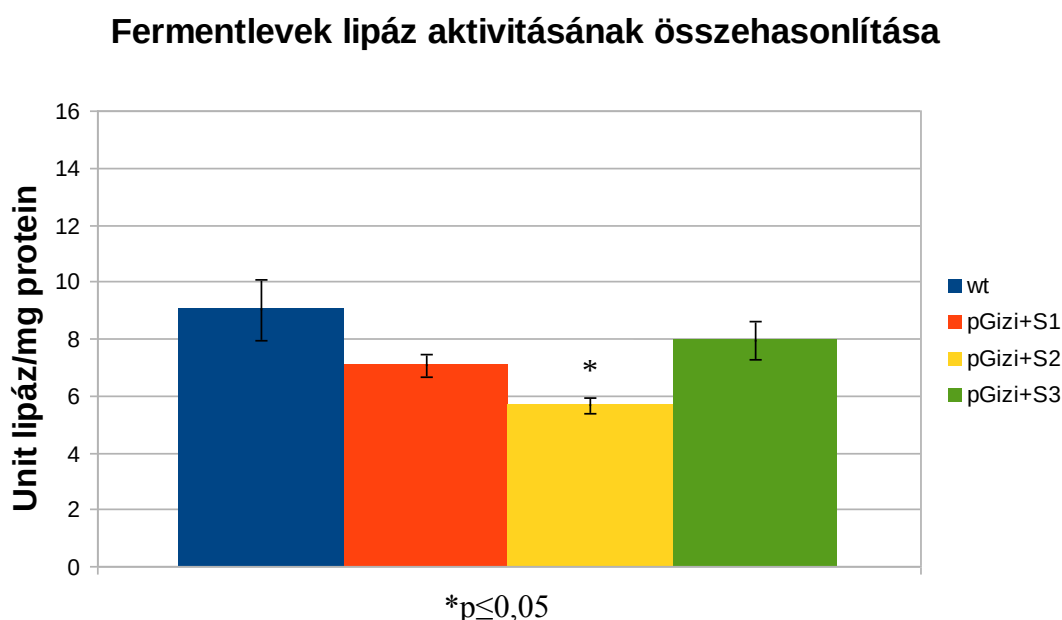
A *LIP2* transzkripció indukálhatósága olívaolaj jelenlétében



11. B ábra: Az üres pGiZi vad típusú törzs *LIP1* és *LIP2* indukálhatóságát bizonyító ellenőrző qRT-PCR eredménye ahol nem induktív YPD+NAT, illetve indukciós YNB+NAT+olívaolaj tápoldatokban történt a törzs tenyésztése

5.4. Lipáz enzimaktivitások mérése az Si-konstrukciókat kifejező és az üres pGiZi vektort hordozó transzformánsokból

Az RNS izoláláshoz készített tenyészetekből elkülönített minták fermentlevén lipáz enzimaktivitás méréseket hajtottunk végre 4-metilumbelliferil-oleát szubsztráttal végzett fluoriméteres aktivitásméréssel. A kapott lipáz aktivitási eredményeket Bradford reagenssel mért összfehérje mennyiségekre normalizálva a 12. ábra mutatja.



12. ábra: A pGiZi-S1Si, pGiZi-S2Si, pGiZi-S3Si és üres pGiZi expressziós konstrukciókat hordozó *C. parapsilosis* GA1 transzformánsok lipáz enzimaktivitásainak mérési eredménye 4-metilumbelliferil-oleát szubsztráttal végzett fluoriméteres aktivitásméréssel

A mért lipáz aktivitások eredményei alapján az S2Si konstrukciót hordozó törzsben detektáltunk szignifikáns aktivitás csökkenést ($p=0,0498$).

6. Összefoglalás

Jelen munkánkban S1Si, S2Si és S3Si csendesítő konstrukciókat hoztunk létre a *C. parapsilosis* *LIP2* génjének csendesítésére. A csendesítés célpontja S1Si és S2Si esetén a *LIP2* gén ORF régiójának 3' vége volt, S3Si esetében pedig a *LIP2* mRNS 3'-UTR régiója. A csendesítő kazettákat pBluescript II SK vektorba segédklónozási lépések sorozatán át készítettük el, majd az összeépített expressziós Si konstrukciókat pGiZi *C. parapsilosis* autonom replikatív vektorba klónoztuk azért, hogy *C. parapsilosis* GA1 vad típusú törzsbe transzformálhassuk és vizsgálhassuk a csendesítés mértékét.

Sikeresen juttattuk be GA1 vad típusú törzsbe a három Si expressziós konstrukciót, valamint kontrollként üres pGiZi vektort. Lipáz aktivitást detektáló rhodamin-B tartalmú táptalajon legalább 20-20 transzformáns lipáz aktivitását monitoroztuk. Minden transzformáns mutatott lipáz aktivitást. Ezt követően 2-2 transzformánst kiválasztottunk minden esetben és "plazmid rescue"-val bizonyítottuk, hogy a konstrukciók extrakromoszómálisan fennmaradnak a transzformánsokban. Az így ellenőrzött 2-2 transzformáns esetén lipáz indukciós körülmények között feltenyésztett mintákból RNS-t vontunk ki, és cDNS írást követően qRT-PCR $\Delta\Delta C_t$ módszerrel a belső kontroll *TUB4* gén alkalmazásával megvizsgáltuk az Si transzformánsok *LIP2* génjének kifejeződését az üres pGiZi vektort hordozó vad típusú törzs expressziós szintjére vonatkoztatva. A kapott eredmények alapján nem tapasztaltunk mRNS szint csökkenést az Si konstrukciókat hordozó törzsekben, ami azonban nem zárja ki, hogy transláció gátláson alapuló csendesítés nem játszódik le. Ezért kvantitatív módszerrel lipáz aktivitást mértünk az RNS kivonáshoz készített tenyészetek fermentlevéből. A három Si konstrukció alkalmazása esetén csak az S2Si konstrukció esetén tapasztaltunk szignifikáns (37%-os) enzimaktivitás csökkenést ($p=0,0498$).

Az S2Si konstrukciót hordozó törzs esetében tapasztalt szignifikáns lipáz aktivitás csökkenés alapján, amely nem állt korrelációban mRNS szint változással, megállapíthattuk, hogy amennyiben van mRNS kifejeződés csendesítés, az nem a mRNS hasításával, hanem a transláció gátlásán keresztül valósulhat meg.

A jövőben tervezzük a jelenség kópiaszám függésének vizsgálatát a kísérleti rendszerünkben, valamint tervezzük az S1, S2 és S3Si konstrukciók egy vektorba történő beépítését és kombinált kifejeztetését.

7. Referenciajegyzék

1. **Pfaller M. A., and Diekema D. J.** (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20:133–163
2. **Trofa D., Gácsér A. and Nosanchuk J. D.** (2008) *C. parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4): 606-625.
3. **Haynes K.** (2001) Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiol.* 9(12):591-596. Review
4. **Yang Y. L.** (2003) Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 36(4):223-228.
5. **Fu Y., Ibrahim A. S., Fonzi W., Zhou X., Ramos C.F., Ghannoum M. A.** (1997) Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology* 143(2):331-340.
6. **Hube B., Stehr F., Bossenz M., Mazur A., Kretschmar M., Schäfer W.** (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol.* 174(5):362-374.
7. **Stehr F., Felk A., Gácsér A., Kretschmar M., Mähneß B., Neuber K., Hube B., Schäfer W.** (2004) Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Research* 4:401-408.
8. **Neugnot V., Moulin G., Dubreucq E., Bigey F.** (2002) The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem* 269:1734–1745

9. **Gácsér A., Trofa D., Schäfer W. and Nosanchuk J. D.** (2007) Targeted gene deletion in *C. parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 117(10):3049-3058.
10. **Nguyen L. N., Gacser A. and Nosanchuk J. D.** (2011) Secreted lipases supply fatty acids for yeast growth in the absence of *de novo* fatty acid synthesis. *Virulence*; 2(6)538-541.
11. **Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V.** (1993): The *C. elegans* heterochromatic gene *lin-4* encodes small RNSs with antisense complementarity to *lin-4*. *Cell* 75:843-854.
12. **Wightman B., Ha I., Ruvkun G.** (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochromatic gene *Lin-4* by *Lin-4* mediates temporal pattern-formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862.
13. **Pontes O. and Pikaard C. S.** (2008) siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. *Curr Opin Genet Dev* 18(2):197–203.
14. **Hawkins P. G. and Morris K. V.** (2008) RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle* 7(5): 602–607.
15. **Tang G.** (2005) siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences* 30: 106-114.
16. **Lavrov S. A. and Kibanov M. V.** (2007) Non-coding RNAs and chromatin structure. *Biochemistry (Moscow)*, 72(13):1422-1438.
17. **Agrawal N., Dasaradhi P. V. N., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R. K. and Mukherjee S. K.** (2003) RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Dec. 2003, p. 657–685.
18. **Sarnow P., Jopling C. L., Norman K. L., Schütz S. and Wehner K. A.** (2006) MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nature Reviews Microbiology* 4:651-659

19. **Zhang B., Wang Q. and Pan X.** (2007) MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *Journal of Cellular Physiology* 210:279–289.
20. **Fulci V. and Macino G.** (2007) Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Current Opinion in Microbiology* 10:199–203.
21. **Nakayashiki H.** (2005) RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. *FEBS Letters* 579:5950–5957.
22. **Nakayashiki H. and Nguyen Q. B.** (2008) RNA interference: role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* 11:494–502.
23. **Drinnenberg I. A., Weinberg D. E., Xie K. T., Mower J. P., Wolfe K. H., Fink G. R., Bartel D. P.** (2009) RNAi in Budding Yeast. *Science* 326: 544-550.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Vágvolgyi Csaba tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra dolgozatom elkészítését az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszéken.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Hamari Zsuzsanna egyetemi docensnek, Karácsony Zoltán PhD hallgatónak, valamint a 310-es labor dolgozóinak a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségét.

Továbbá köszönöm a Mikrobiológia Tanszék dolgozóinak tanácsait, támogatását.

9. Nyilatkozat

”Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez”

Alulírott *Ámon Judit* a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- a klónozási munkákat:
 - restrikciós endonukleáz használata
 - ligálás
 - defoszforilálás
 - plazmid mini- és maxipreparátumok készítése
- a PCR reakciók összemérését
- a PCR termékek tisztítását
- a DNS visszaizolálását gélkockából, és a DNS tisztítását
- az *E. coli* és *Candida* kompetens sejtek készítését és transzformációját
- a totál DNS kivonást *Candida*ból
- az RNS kivonást *Candida*ból
- a qRT-PCR reakciók összemérését és analízisét
- a lipáz aktivitás kimutatását táptalajon és fermentléből

munkafolyamatokat én végeztem el.

aláírás

Szeged, 2012. december 20.