

XXXI. OTDK Biológia Szekció
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék
Biológus szak

TDK DOLGOZAT

**HMG-KoA reduktáz gének kifejeződésének és
funkciójának vizsgálata *Mucor circinelloides*ben**

Farkas Anita

II. évfolyam M.Sc.



Témavezető: Dr. Papp Tamás
Egyetemi docens

2012

Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A terpén bioszintézis	4
2.2. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A reduktáz	6
2.3. A <i>M. circinelloides</i> HMG-KoA reduktázai.....	8
2.4. A HMG-KoA reduktáz funkciója	8
3. Célkitűzések	11
4. Anyagok és módszerek.....	12
4.1. Felhasznált törzsek.....	12
4.2. Táptalajok, tápoldatok.....	12
4.3. Vizsgálati módszerek.....	13
4.3.1. Kompetens <i>Escherichia coli</i> sejtek készítése	13
4.3.2. Baktérium transzformáció	13
4.3.3. Agaróz gélelektroforézis	14
4.3.4. Protoplaszt készítés	14
4.3.5. Protoplasztok transzformációja.....	14
4.3.6. Plazmid tisztítás.....	15
4.3.7. Kvantitatív valós idejű PCR (qPCR) kísérletek	15
4.3.9. Ergoszterin kivonás és mennyiségi meghatározása.....	17
4.3.10. Mikroszkópos vizsgálatok.....	18
5. Eredmények, értékelés	19
5.1. A HMG-KoA reduktáz gének kifejeződése.....	19
5.1.1. A gének kifejeződése a tenyésztési idő alatt	19
5.1.2. Különböző szénforrások hatása a gének kifejeződésére	20
5.1.3. A gének kifejeződése különböző hőmérsékleten.....	21
5.1.4. A gének kifejeződése aerob és anaerob körülmények között	21
5.1.5. Só stressz hatása a gének kifejeződésére	22
5.2. A gének poszt-transzkripcionális csendesítése.....	23
6. Összefoglalás	30
7. Irodalomjegyzék.....	31
8. Köszönetnyilvánítás	35
9. Nyilatkozat.....	36

1. Bevezetés

A *Mucor circinelloides* a járomspórás gombák (Mucoromycotina) közé tartozó karotinoid termelő gomba, melyet modellorganizmusként használnak a karotintermelés biokémiai és genetikai folyamatainak tanulmányozására. A különböző terpénszármazékok képződésének közös útvonala az acetát-mevalonát út, melynek központi sebesség-meghatározó lépése a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) átalakulása mevalonsavvá, melyet a HMG-KoA reduktáz katalizál. A HMG-KoA reduktázt kódoló *hmgR* gén kópiaszáma az egyes élőlényekben eltérő. *M. circinelloides* genomja három *hmgR* gént kódol (*hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3*), melyekről funkcióképes fehérje íródik át. Más organizmusokban, melyek több kópiában hordozzák a gént, megfigyelték az egyes géntermékek eltérő szabályozását és azok szerepét a környezethez való alkalmazkodásban és a különböző élettani folyamatokban.

Laborunkban korábban izolálták a *M. circinelloides* három *hmgR* génjét, melyekre alapozva expressziós vektorokat készítettek. A vektorok felhasználásával túlműködtetett mutánsokat hoztak létre, melyek fenotípusát jellemezték. A *hmgR3* gén túlműködtetése során a gomba karotinoid produkciója megnőtt és sztatinokkal (a HMG-KoA reduktáz szelektív inhibitorai) szembeni érzékenysége csökkent.

Ezen eredmények ismeretében célul tűztük ki magunk elé a gének kifejeződésének vizsgálatát a tenyésztési idő alatt, a spórák csírázásától kezdődően, különböző hőmérsékleten és különböző szénforrásokon. Vizsgáltuk a só stressz hatását is a gének kifejeződésére. *M. circinelloides*re jellemző a morfológiai dimorfizmus képessége, vagyis hogy az egyébként fonalas gomba bizonyos körülmények között (pl. magas glükóz koncentráció jelenlétében vagy anaerob környezetben) élesztőszerű növekedést mutat. Ezért megvizsgáltuk a gének relatív-transzkripciós szintjének változását aerob és anaerob körülmények között is. Az eredmények azt mutatják, hogy mindhárom gén kifejeződik, de eltérő mértékben. A vizsgált körülményeket tekintve elmondhatjuk, hogy a *hmgR2* az, amely a legmagasabb expressziós szintet mutatja, míg a *hmgR1* relatív transzkripciója végig alacsony szinten marad.

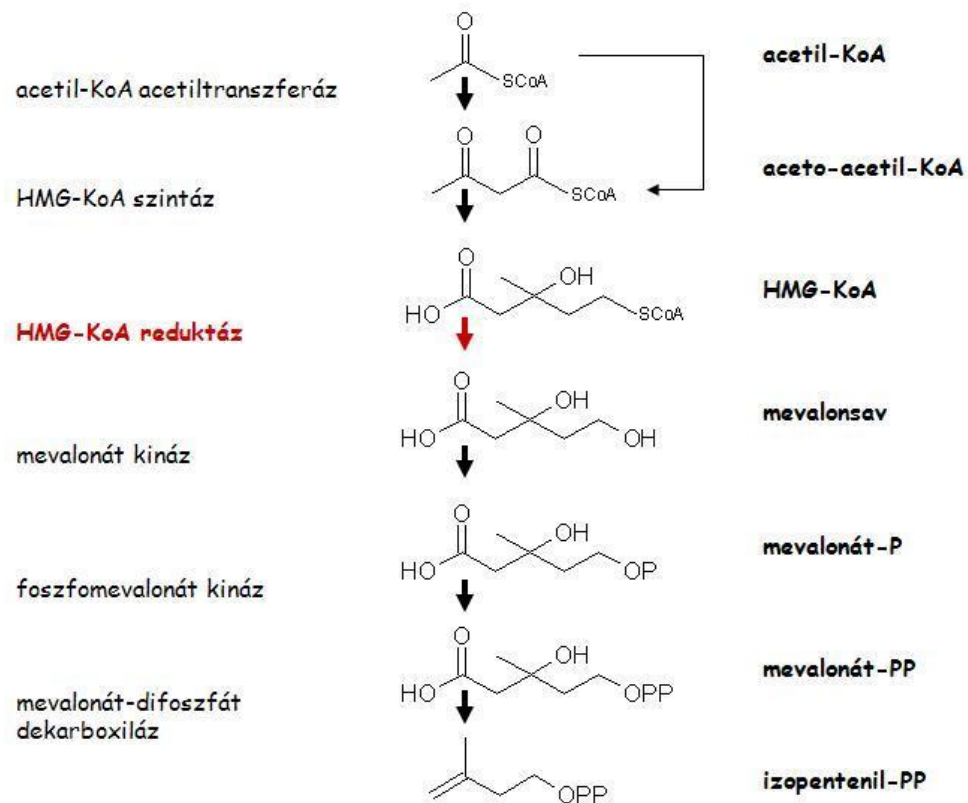
Kísérleti munkánk második részében a gének funkcionális elemzése céljából, olyan vektorkonstrukciókat építettünk, melyek segítségével géncsendesített mutánsokat hoztunk létre. A *hmgR3* gén csendesítése során kapott transzformánsok, mind morfológiájukban, mind a spórák csírázó képességében megváltozott fenotípust mutatnak.

2. Irodalmi áttekintés

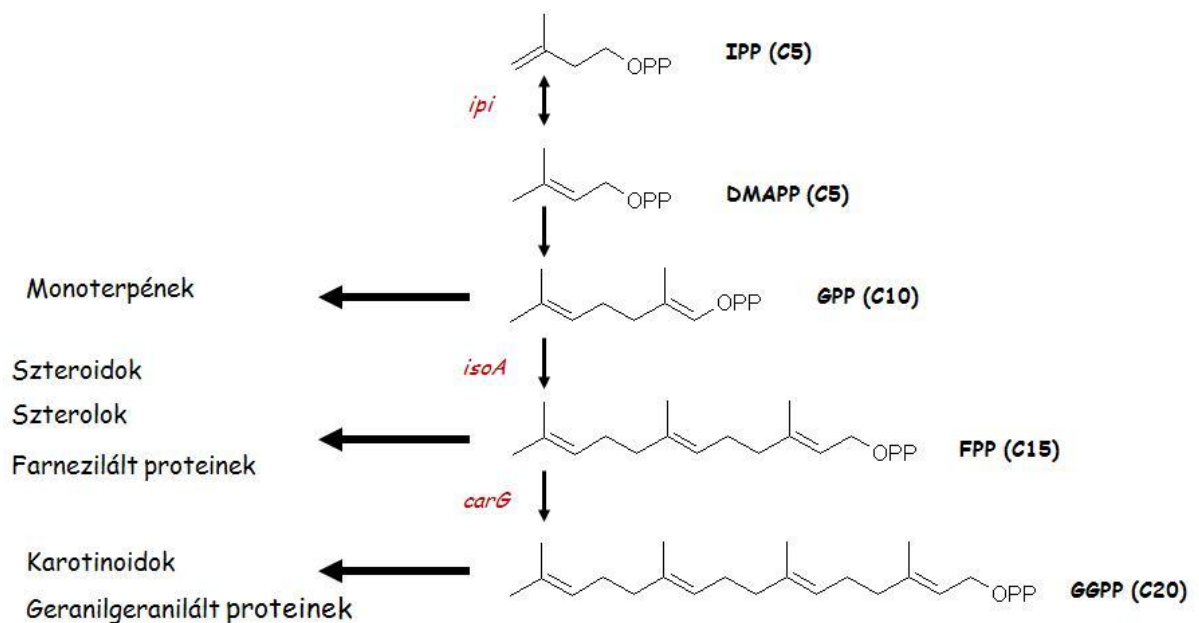
2.1. A terpén bioszintézis

A terpenoidok vagy más néven izoprenoidok olyan több szénatomos molekulák, amelyek izoprénegységek kapcsolódása során keletkeznek. Az ebbe a csoportba tartozó vegyületek lehetnek sejtmembrán alkotók (pl. ergoszterin, koleszterin), különféle hormonok, illetve hormonhatású vegyületek (pl. gibberellinek, szteroid hormonok), az ubiquinonok terpén csoportja, másodlagos anyagcsere termékek (pl. szeszkviterpének, szeszterpének, triterpének, stb.) és színanyagok (pl. karotinok). Részt vesznek más molekulák szerkezetének kialakulásában is. Egyes fehérjék funkciós csoportját adhatják, melyek számos biológiai folyamatban fontos szerepet játszanak (pl. Ras fehérjék). A terpén bioszintézis a legtöbb élőlényben az úgynevezett acetát-mevalonát útvonalon keresztül zajlik. Növényi kloroplasztiszbán és baktériumokban létezik egy nem mevalonát reakció út is, az úgynevezett metileritritol-4-foszfát út. Mindazonáltal gombákban csak az acetát-mevalonát utat írták le (**1. ábra**). A bioszintézis út első lépéseként acetoacetyl-koenzim A vagy acetyl-koenzim A kondenzációjával 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) keletkezik, majd ezt a HMG-KoA reduktáz alakítja tovább mevalonsavvá. Ez az átalakulás a bioszintézis útvonal központi lépése. A mevalonsavból alakul ki az 5-foszfomevalonát, mely tovább alakul 5-pirofoszfomevalonáttá, amiből keletkezik az öt szénatomos izopentenil pirofoszfát (IPP), amely az izoprén vázas vegyületek építőegysége.

A bioszintézis útvonal az IPP kialakulása után többfelé ágazik le (**2. ábra**). Az izoprén bioszintézis útvonalon keresztül keletkeznek a különféle terpénvegyületek prekursorai. Az útvonalon az IPP dimetilalil-pirofoszfáttá alakul (DMAPP), majd IPP csoportok további bekapcsolódásával hosszabbodik az izoprén váz. A kialakult 10 szénatomos geranilpirofoszfát (GPP), a monoterpének, a 15 szénatomos farnezil-pirofoszfát (FPP) a szteroidok, szterolok és egyéb triterpének, míg a 20 szénatomos geranilgeranil-pirofoszfát a karotinoidok prekursor vegyülete. A keletkező vegyületek igen fontos biológiai funkciókat töltenek be. Az útvonalon keresztül szintetizálódó ergoszterin a gomba sejtmembrán egyik fő alkotó szterolja. A FPP-ről és GGPP-ről keletkező farnezol és geranilgeranol számos fehérje funkciós csoportját biztosítják, melyek részt vesznek az elektron transzportban, glikoprotein bioszintézisben, transzlációban, a DNS replikációban, és apoptotikus útvonalakban. Két 20 szénatomos GGPP kondenzációjával alakul ki a szintelen fitoén, mely a specifikus karotin bioszintézis út első köztterméke.



1. ábra. A mevalonsav bioszintézis út, melynek végterméke az izopentenil pirofoszfát, az izoprénvázas vegyületek építőeleme. A folyamat központi lépése a HMG-KoA átalakulása mevalonsavvá.

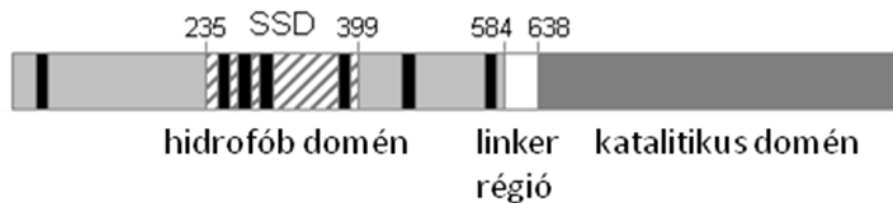


2. ábra. Az izoprén bioszintézis útvonal, amely során öt szénatomos izoprén egységek összekapcsolódásával hosszabbodik az izoprén váz. Erről az általános útról ágazódnak le az egyes terpének specifikus bioszintézis útvonalai.

2.2. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A reduktáz

A terpén bioszintézis központi lépése a HMG-KoA átalakulása mevalonsavvá, melyet a HMG-KoA reduktáz katalizál. Az enzimet kódoló gént sikeresen izolálták számos élőlényből; pl. *Drosophila melanogaster* (Gertler és mtsi. 1988), kínai hörcsög (Chin és mtsi. 1984), *Arabidopsis thaliana* (Caelles és mtsi. 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (Basson és mtsi. 1988) és *Phycomyces blakesleeanus* (Corrochano és Avalos 1992) esetében. A *hmgR* gén emlősökben egy (Ruiz-Albert és mtsi. 2001), *S. cerevisiae*ben két kópiában van jelen (Burmester és Czempinski 1993, Koning és mtsi. 1996). Növényekben a géneket fajtól függő számban egy multigén család kódolja (Stermer és mtsi. 1994). Járomspórás gombák esetében a gének kópiaszáma igen változatos. Egyes fajok csak egy *hmgR* gént hordoznak, ilyen a *P. blakesleeanus* (Ruiz-Albert és mts. 2001) és a *Rhizomucor miehei* (Lukács és mtsi. 2008). A *M. mucedo* genomjában két *hmgR* gén található. Ezzel szemben a *M. circinelloides* genomja három *hmgR* gént tartalmaz (Lukács és mtsi. 2008).

Az enzimnek két típusa ismert. Az I. típusú HMG-KoA reduktáz az eukarióta élőlényekre és néhány archaeára, míg a II. típusú az eubaktériumokra és a legtöbb archaeára jellemző. A két típus felépítése és sztatín (a HMG-KoA reduktáz szelektív inhibitorai) kötő módja is eltérő. A bakteriális HMG-KoA reduktáz csupán katalitikus doménből áll és nem tartalmaz transzmembrán régiót. A I. típusú HMG-KoA reduktázok rendelkeznek egy hidrofób N-terminális régióval, amely számos (2-8) transzmembrán domént tartalmaz, illetve egy hidrofil C-terminális régióval, mely az aktív centrumot foglalja magába. Az N-terminális hidrofób régió része az úgynevezett szterol érzékelő domén (SSD, *Sterol Sensing Domain*), mely részt vesz az enzimszint poszt-transzlációs szabályozásában (Loftus és mtsai. 1997, Brown és Goldstein 1999, Davies és Ioannou 2006). Az enzim transzlációját, stabilitását és degradációját a terpenoid bioszintézis út köztitermékei is szabályozzák (Goldstein és Brown 1990). A fehérje C-terminális része egy erősen konzervált domén, amely az enzim katalitikus aktivitásáért felelős (Hampton és Rine 1994). Ez a konzerváltság minden eukarióta szervezetben megfigyelhető. A hidrofób N-terminális domén és a hidrofil C-terminális domén között egy rövid összekötő („linker”) régió található, mely *R. miehei* esetében 53 aminosav hosszúságú. Járomspórás gombák esetében a transzmembrán domének száma változatos. *R. mieheii* HMG-KoA reduktáz 7 (3. ábra), *P. blakesleeanus* esetében 8 transzmembrán régiót azonosítottak.



3. ábra. A *Rhizomucor miehei* HMG-KoA reduktázának szerkezete. Az N-terminális rész (hidrofób domén, világosszürke) tartalmazza a szterol érzékelő domént (csíkozott rész) és a 7 transzmembrán régiót (fekete sávok), amit a linker régió (fehér) kapcsol össze a C-terminális (hidrofil domén, sötétszürke) katalitikus régióval (Lukács és mtsai. 2009).

A HMG-KoA reduktáz szabályozása nagyon összetett. A transzkripció és transláció szintjén, illetve a fehérje degradációban is fontos szabályozó szerepet töltenek be az izoprének bioszintézise során képződő metabolitok és végtermékek, így pl. a szterolok vagy az FPP, is hatással van az enzim aktivitására (Brown és Goldstein 1980). *S. cerevisiae*-ben vizsgálva a HMG-KoA reduktáz szabályozását azt vették észre, hogy a geranilgeranol és a farnezol is, negatív visszacsatolással szabályozza a gén kifejeződését. Emlősökben megfigyelték, hogy a farnezol indukálta apoptózist az enzim csökkent mennyisége kíséri. Ezen kívül a HMG-KoA reduktáz gátlása endoplazmatikus retikulum stressz választ vált ki, amely szintén apoptózishoz vezet (Joo és Jetten 2010). *C. albicans*-ban is megfigyelték a farnezol szerepét az apoptotikus folyamatokban (Shirtliff és mtsi. 2009).

Az enzim emlősökben az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjához kapcsolódik (Breitling és Krisans 2002). *S. cerevisiae*-ben két izoformát mutattak ki, melyek nem csak lokalizációjukban, de funkciójukban és szabályozásukban is különbséget mutatnak. A fehérjék az ER két különböző régiójában foglalnak helyet. Míg az egyik a sejtmaghoz egész közel, a másik ettől távol helyezkedik el (Koning és mtsi. 1996). *A. thaliana*-ban két gént azonosítottak, amely a HMG-KoA reduktáz három izoformáját kódolja. A *hmgR1*-ről kettő, a *hmgR2*-ről egy fehérje íródik át. *Arabidopsis*-ban és más növényekben három kompartmenthez köthető az enzim, az ER-hez, a plasztiszhoz és a mitokondriumhoz (Leivar és mtsi. 2005, Stermer és mtsi. 1994). *Hortaea werneckii* extrémofil gombában két izoformát azonosítottak, melyek az ER-hez, illetve a mitokondriumhoz kötődtek (Vaupotic és Plemenitas 2007).

2.3. A *M. circinelloides* HMG-KoA reduktázai

Amint korábban említettem, a gomba genomja 3 *hmgR* gént (*hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3*) tartalmaz. Korábban a laborunkban ezeket a géneket izolálták és megkezdték a funkcionális vizsgálataikat. Az **1. táblázat** mutatja a fehérjék főbb jellemzőit.

1. táblázat. A *M. circinelloides* HMGR1, HMGR2 és HMGR3 fehérjéinek főbb jellemzői.

	HMGR1	HMGR2	HMGR3
Hossz	1107 as	1084 as	1115 as
Molekuláris tömeg	120.78 kDa	119.07 kDa	120.71 kDa
Izoelektromos pont	8.86	8.33	8.43
Transzmembrán hélixek száma	6	8	5
SSD elhelyezkedése	244-407 as	236-388 as	279-443 as
Katalitikus domén	653-1107 as	633-1084 as	692-1115 as
HMG kötő motívum	717-727 as (CENVIGYMPIP), 745-755 as (MATTEGCLVAS)	697-707 as (CENVIGYMPIP), 725-735 as (MATTEGCLVAS)	756-706 as (CENVIGYMPIP), 784-794 as (MATTEGCLIAS)
NAD(P)H kötő motívum	841-848 as (GDAMGMNM), 991-997 as (GTVGGGT)	821-828 as (GDAMGMNM), 971-977 as (GTIGGGT)	880-887 as (GDAMGMNM), 1030-1036 as (GTIGGGTI)

A táblázatból látszik, hogy a transzmembrán hélixek számában nagy különbségek vannak. Mind a három fehérjében azonosították a HMG-KoA és a NAD(P)H kötésért felelős konzervált felismerő helyeket, azonban két különbséget lehet felfedezni a felismerő helyekben. A HMGR3 második HMG-KoA kötő helyében történt egy Val-Ile csere és hasonló cserét láthatunk a HMGR1 második NAD(P)H kötő helyében is, ahol egy Ile-Val csere történt. A sejten belüli izoprének mennyiségének mérését és az enzim szabályozását végző SSD-ben is különbséget találtak. A HMGR2 SSD-je 11 aminosavval rövidebb, mint a HMGR1 és 12 aminosavval rövidebb, mint a HMGR3 SSD-je. Valószínűleg e miatt az aminosav hiány miatt a fehérjék poszt-transzlációs szabályozása és szterol érzékelő képessége eltérő lehet.

2.4. A HMG-KoA reduktáz funkciója

A HMG-KoA reduktáz központi szerepet játszik az izoprenoid bioszintézis során. Növényekben az enzim aktivitása magas értékeket mutat fiatal merisztematikus szövetekben (Stermer és mtsi. 1994) és az embrióban a magfejlődés során. Az izoprén

bioszintézis termékei, mint a szterolok, a fitoalexinek, karotinoidok vagy a növekedést befolyásoló növényi hormonok (citokininek, gibberellinsav, abszcizinsav) kritikus szereppel bírnak a metabolizmusban, a növekedésben és a fejlődésben. Ezek növényi szövetekre specifikusan meghatározott időben szintetizálódnak. A magfejlődés korai szakaszában, amire intenzív sejtosztódások jellemzőek, szükség van olyan izoprén komponensekre, mint a membránalkotó szterolok és elektrontranszport lánc komponensek (Moore és Oishi 1993). A HMG-KoA reduktáz esszenciális a sejtdifferenciálódás és a sejtnövekedés folyamatához. Az enzim *S. cerevisiae*-ben is fontos szerepet tölt be a vegetatív sejtek növekedésében, illetve a spórák csírázásában (Basson és mtsi. 1986).

Emlős és gomba sejtekben a HMG-KoA reduktáz kompetitív inhibitorai (pl. sztatinok) gátolják Ras szignálkomponens termelődését a protein preniláció indirekt gátlásán keresztül. A Ras a *Mucor racemosus* dimorf gombában szerepet játszik a morfogenezisben. A HMG-KoA reduktáz lovasztatinnal történő gátlásával csökken a növekedési ráta és olyan morfológiai és biokémiai változások következnek be, amik apoptózishoz vezetnek (Roze és Linz 1998). Lovasztatin indukálta apoptózist humán rákos sejtvonalakban is megfigyeltek, a Ras fehérje és prenilék gátlásával (Agarwall és mtsi. 1999).

H. werneckii halofil élesztőgombával végzett kísérletek során azt tapasztalták, hogy a HMG-KoA reduktáz szint és aktivitás megnőtt az optimálisnál alacsonyabb és magasabb só koncentráció mellett, míg optimális só koncentráció esetében az enzim degradációja volt jellemző. Az enzim lovasztatinnal történő gátlása ozmotikusan szenzitív fenotípust eredményezett (Vaupitič és mtsi. 2008). Az eredmények arra utalnak, hogy az enzim hozzájárul a *H. werneckii* halotoleráns karakterének kialakításához. A sejtmembrán esszenciális faktor a sejtek túléléséhez az extrémofil mikroorganizmusokban, melyek extrém környezeti hatásoknak (hőmérséklet, nyomás, só) vannak kitéve. *Haloferax volcanii* archaea baktériumnál megfigyelték a sejtmembrán lipid és karotinoid tartalmának változásait a só koncentráció változtatásával (Bidle és mtsi. 2007). Ezen molekulák szintén az izoprenoid bioszintézis során jönnek létre.

S. cerevisiae-ben két *hmgR* található, melyekről két funkcionálisan aktív HMG-KoA reduktáz íródik át. A *hmgR1* túlműködtetése ER membrán proliferációt indukál a sejtmaghoz közeli területen, ahol a fehérje is lokalizálódik. Kimutatták, hogy anaerob körülmények között a *hmgR1* gén expressziója lecsökken, míg a *hmgR2* gén expressziója megnő. Valószínűleg utóbbi hozzájárul az oxigénmentes környezethez való alkalmazkodáshoz (Hampton és Rine 1994). Előállítottak olyan mutánsokat, melyekben

nem funkcionáltak az egyes *hmgR* gének. Azt tapasztalták, hogy a mutánsok életben maradásához szükséges és egyben elégséges is egyetlen kópia (Basson és mtsi 1987, Seong és mtsi. 2006).

Kísérletekkel igazolták, hogy a HMG-KoA reduktáz befolyásolja a gabonákat betegítő *Fusarium graminearum* virulenciáját. Létrehoztak olyan mutánsokat, melyekben az enzim katalitikus doménje érintetlen maradt, csak a transzmembrán doménben történt mutáció. A mutánsok csökkent növekedést és virulenciát mutattak (Seong és mtsi. 2006).

Látható, hogy a szakirodalomban a HMG-KoA reduktázoknak számos funkciót tulajdonítanak. Ez felveti a kérdést, hogy a *M. circinelloides* három génje közt van-e funkcióbeli különbség, mely gén van hatással a morfológiára, az egyes környezeti hatásokhoz való alkalmazkodásra és milyen további funkciókat rendelhetünk még hozzájuk.

3. Célkitűzések

A Tanszékünkön korábban izolálták a *Mucor circinelloides* MS12 törzsének HMG-KoA reduktáz génjeit (*hmgR1*, *hmgR2*, *hmgR3*), melyekre alapozva expressziós vektorokat építettek. Ezek segítségével az egyes géneket túlműködtető mutánsokat hoztak létre. Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a *hmgR2* és *hmgR3* túlműködése során a karotin tartalom megemelkedett, valamint a sztatinnal szembeni érzékenység nagymértékben csökkent. Ezen változások a *hmgR3* túlműködtetése esetében voltak a legszembetűnőbbek. A túlműködtetett mutánsok ergoszterin tartalmának vizsgálata során azt tapasztalták, hogy a *hmgR2* túlműködtetésével nőtt a sejtek ergoszterin tartalma, míg a *hmgR1* és *hmgR3* túlműködtetése nem vagy csak kis mértékben emelte az ergoszterin mennyiséget. Ezen eredmények ismeretében és az irodalmi adatok tükrében a következő konkrét célokat tűztük ki magunka elé:

1. A gének relatív transzkripció szintjének meghatározása kvantitatív PCR (qPCR) segítségével.

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a gének kifejeződését különböző tenyésztési körülmények mellett, a spórák csírázásától kezdődően a tenyésztési idő alatt, különböző hőmérsékleten és különböző szénforrásokon. Tanulmányozzuk a NaCl hatását a gének kifejeződésére. Ebből a szempontból vizsgáljuk az oxigén hatását is, ezért aerob és anaerob tenyésztés mellett is mérjük a gének relatív transzkripció szintjét.

2. A gének funkcionális elemzése antiszensz RNS (asRNA) alapú géncsendesítéssel.

További célunk mindhárom gén poszt-transzkripcionális csendesítése antiszensz RNS technika alkalmazásával. Olyan vektorkonstrukciókat építünk, amelyek a gén egy szakaszát fordított orientációban tartalmazzák, így a gombába transzformálva a természetes mRNA sorrendjével komplementer RNS-t fejeztetünk ki. Ezzel a módszerrel szeretnénk csökkenteni a képződő enzim mennyiségét és a transzformánsok elemzéséből következtetéseket levonni a funkciójára vonatkozóan.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált törzsek

A klónozási munkákat az *Escherichia coli* TOP10F⁻ törzsszel végeztük.

A gomba transzformációhoz és a gének transzkripciójának vizsgálatához a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* CBS 277.49 *leuA*⁻ és *pyrG*⁻ mutáns törzsét, az MS12-t használtuk.

Az összehasonlító vizsgálatokhoz (makro és mikromorfológia, apoptózis) a laborunkban korábban létrehozott *hmgR2* és *hmgR3*-as gént plusz kópiában hordozó transzformánsok egy-egy (MS12-pNG2-1 és MS12-pNG3-1) törzsét használtuk.

4.2. Táptalajok, tápoldatok

YNB tápoldat: 1% glükóz
 0,15% (NH₄)₂SO₄
 0,15% Na-L-glutaminát
 0,05% Yeast Nitrogen Base
 0,05% uracil/leucin, amennyiben szükséges volt

YNB táptalaj: 1% glükóz
 0,15% (NH₄)₂SO₄
 0,15% Na-L-glutaminát
 0,05% Yeast Nitrogen Base
 2% agar
 0,05% uracil/leucin, amennyiben szükséges volt

A különböző szénforrások génexpresszióra kifejtett hatásának vizsgálatához a glükózt lecseréltük trehalózra, maltózra, dihidroxi-acetonra vagy Na-acetátra. A szénforrások a táptalajban 1%-ban voltak jelen.

A só stressz hatásának vizsgálatához a táptalajt kiegészítettük NaCl-dal, mely 1, 2, illetve 3 %-ban volt jelen a táptalajban

LB tápoldat: 1% tripton
 0,5% élesztőkivonat
 1% NaCl

LB táptalaj: 1% tripton
0,5% élesztőkivonat
1% NaCl
2% agar

YPG tápoldat: 2% glükóz
0,3% élesztőkivonat
1% pepton

YEG táptalaj: 1% glükóz
0,5% élesztőkivonat
1% agar

4.3. Vizsgálati módszerek

4.3.1. Kompetens *Escherichia coli* sejtek készítése

E. coli TOP10F⁻ egy éjszakán át nevelt tenyészet 1ml-ét 30 ml LB tápoldatba átoltva a baktériumokat 37 °C-on növesztettük OD₆₆₀ = 0,5 érték eléréséig. A tenyészetet centrifugáltuk (7000 rpm/10perc, 4 °C), ezután a sejteket, az átoltott tenyészettel 1:1 arányban, 50 mM CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk. Tíz percig jeges vízfürdőben inkubáltuk, majd a sejteket ismét kiülepítettük (7000 rpm/10 perc 4 °C). Ezután a sejteket 1/20 térfogatú, 50 mM hideg CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk és 1 órán át jégfürdőben inkubáltuk. A kompetens sejteket 15% glicerinnel hozzáadása után -70 °C-on tároltuk.

4.3.2. Baktérium transzformáció

100 µl fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 5-10 µl plazmidot és 100 µl TCM puffert (10 mM Tris, pH 7,5; 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂) adtunk hozzá, és a baktériumokat 25 percig jégen inkubáltuk. Ezután 3 perc 30 másodpercre 37°C-ra tettük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Végül a baktériumsejteket ampicillin tartalmú (100 µg/ml) LB táptalajra szélesztettük. Amennyiben szükséges volt 50

μl IPTG (izopropil-béta-D-tiogalaktopiranozid, 20 mg/ml) és 50 μl X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol-béta-D-galaktopiranozid, 20 mg/ml) jelenlétében.

4.3.3. Agaróz gélelektroforézis

A DNS minták gélelektroforézisét 0,8%-os agaróz/TAE gélen (40 mM Tris-ecetsav, pH 7,6; 1 mM Na₂EDTA) végeztük (80V). A nukleinsavakat etídium-bromidos festéssel (0,5 μg/ml) UV-fényben detektáltuk. A molekulák méretének meghatározásához 1 kb-os molekulasúly markert (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas) használtunk. A DNS gélből történő visszaizolálásához Silica Bead DNA Gel Extraction kit-et (Fermentas) használtuk a gyártó utasítása szerint.

4.3.4. Protoplaszt készítés

A spóraszuszpenziót YEG táptalaj felszínére helyezett celofánra leoltottuk oltókoronggal. A telepeket 16 órán át növesztettük, majd protoplasztáló oldatba (1,5 % *Helix pomatia* enzim kivonat, 10 mM Na-foszfát puffer, pH 6,4; 0,55 M szorbit) helyeztük. Két-három óra inkubáció után a képződött protoplasztokat centrifugálással összegyűjtöttük.

4.3.5. Protoplasztok transzformációja

Az általunk alkalmazott módszer a van Heeswijk és Roncero (1984) által leírt PEG mediált transzformáció módosítása. A protoplasztokat összegyűjtöttük centrifugálással (3000 rpm/10 perc, 4°C), majd mostuk 5 ml SMC pufferrel (50 mM CaCl₂; 10 mM MOPS; 0,55 M szorbit). Az SMC pufferrel történő mosást megismételtük és a protoplasztokat ismét lecentrifugáltuk. Ezután 200 μl SMC pufferben felvettük a sejteket és 20 μl plazmidot, illetve 20 μl PMC (40 % PEG 4000, 10 mM MOPS 0,5 M, 0,4 M szorbit, 50 mM CaCl₂) puffert adtunk az elegyhez. Ezt 30 percre jégre helyeztük, majd 2,5 ml PMC puffer hozzáadását követően 25 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A mintákat 25 ml SMC pufferrel hígítva lecentrifugáltuk (3200 rpm/15 perc, 4°C). A kiülepedett protoplasztokat 0,55 M szorbitot tartalmazó YPG tápoldatba felvettük és fél órán át regeneráltattuk szobahőmérsékleten. Ezután lecentrifugáltuk a protoplasztokat, SMC pufferrel átmostuk, majd 1 ml SMC-ben felvettük és 0,55 M szorbittal kiegészített YNB fedőagarral (1% agar) összekeverve kiöntöttük a 0,55 M szorbitot tartalmazó YNB táptalaj felületére. A csészéket a transzformáns telepek megjelenéséig (4-5 napig) szobahőmérsékleten inkubáltuk.

4.3.6. Plazmid tisztítás

Az *E. coli* baktériumban felszaporított plazmidokat Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction System (Viogene) izoláló kittel nyertük ki a baktériumokból a gyártó utasítása szerint.

4.3.7. Kvantitatív valós idejű PCR (qPCR) kísérletek

A génexpressziós vizsgálatokhoz a *M. circinelloides* MS12 jelű törzsét használtuk. Az RNS izolálást E.Z.N.A.® Total RNA Kit segítségével végeztük el a gyártó utasítása szerint. A vizsgálat során C1000 Thermal Cycler-t CFX96 Real-Time System detektáló rendszerekkel alkalmaztunk. Belső kontrollként a *M. circinelloides* aktin génjét használtuk. A relatív transzkripció szintek meghatározására a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ számítási módszert alkalmaztuk (Livak and Schmittgen, 2001). A gének transzkripció szintjét minden esetben a *hmgR1* gén transzkripció szintjéhez viszonyítottuk adott körülmények között.

DNáz kezelés

1 µg RNS

1 µl 10x-es puffer MgCl₂-al

kiegészítve 9 µl-re DEPC (dietil-pirokarbonát, Fermentas) kezelt vízzel

1 µl DNáz, RNáz mentes (1 U/µl, Fermentas)

30 perc inkubálás 37 °C-on, az inkubálást követően 1 µl 25mM EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav) hozzáadása után 10 perc 65 °C-on további inkubálás. A DNáz kezelést követően ellenőrző PCR-t végeztünk a DNáz kezelés hatékonyságának ellenőrzésére.

cDNS szintézis

A cDNS szintézishez RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Fermentas) használtunk a gyártó utasításai szerint.

qPCR

A qPCR kísérletekben használt reakció elegyhez a Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)-t (Fermentas) használtuk.

A reakciókörülmény a következők voltak:

10 µl SYBR Green

0,8 – 0,8 µl primer

8 µl cDNS

0,4 µl víz

A *hmgR1* génre írt indítószekvenciák:

H1_RT_F: 5' CAG AAA CAA CTC ACA TGC CTT GCC 3'

H1_RT_R: 5' TAA TAG CTG GAA GTG GAT CGT CGG 3'

A *hmgR2* génre írt indítószekvenciák:

H2_RT_F: 5' CTC GTA TCA TCT GTG CCT CTG 3'

H2_RT_R: 5' AGC AGT GTT ACG GTT GTG AG 3'

A *hmgR3* génre írt indítószekvenciák:

H3_RT_F: 5' GAA TCC AGT CTG TTG CCT CTC CA 3'

H3_RT_R: 5' GAG TCA CCG TCA ATG TTC ATG GGA 3'

Az amplifikálás körülményei következők voltak:

95°C, 3 perc

40 ciklus

95°C, 30 másodperc

60°C, 30 másodperc

72°C, 30 másodperc

4.3.8. A géncsendesítéshez használt plazmidok építése

A plazmid konstrukciók elkészítését (restrikciós emésztések és ligálás) a standard módszerek szerint végeztük (Sambrook és mtsi. 1989) mindig az adott körülményekhez optimalizálva. A plazmid DNS tisztításához a Viogene Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System (Viogene), illetve a Viogene Midi-V100TM Plasmid DNA Extraction System (Viogene), a PCR és emésztés során kapott fragmentumok gélből történő visszanyeréséhez Viogene Gel-MTM Gel Extraction System (Viogene) kitéket használtuk a gyártó utasítása szerint.

A *hmqR1* génre írt indítószekvenciák:

H1_CS_F: 5' TTC **GCG GCC GCT** CAC TGG CTT CAT GAA CCG GCT 3'

H2_CS_R: 5' CCG **CTC GAG** AGC AAT GTT CTT CAT AAT CCG AA 3'

A *hmqR2* génre írt indítószekvenciák:

H2_CS_F: 5' TTC **GCG GCC GCA** GAT AAC CCG TTC CGA TAT TTG 3'

H2_CS_R: 5' CCG **CTC GAG** TCA TTG TCA TGT AGT TTG GTT GT 3'

A *hmqR3* génre írt indítószekvenciák:

H3_CS_F: 5' TTC **GCG GCC GCT** CCA GCG TCT TTG GCA AAG GCA 3'

H3_CS_R: 5' TTC **CTC GAG** GGT GTC CCG TGT TGG AGA GCG AC 3'

Az indítószekvenciákba tervezett restriktációs hasító helyeket vastagon szedett betűk jelzik.

A géncsendesítéshez felhasznált génszakaszok amplifikálásához a reakciót *Taq* DNS polimerázzal állítottuk össze. A reakciókörülmények a következők voltak:

5 µl dNTP-mix (2 mM) 2,5 µl *Taq* puffer (10x)

2,5 µl MgCl₂ 1-1 µl primer (10 µM) 1 µl *Taq* polimeráz (5 U/µl)

1 µl templát DNS 11 µl desztillált víz

Az amplifikálás körülményei a következők voltak:

95°C, 3 perc

30 ciklus

95°C, 1 perc

65°C, 1 perc

72°C, 1 perc

72°C, 10 perc

4.3.9. Ergoszterin kivonás és mennyiségi meghatározása

Az ergoszterin kivonást az Alcazar-Fuoli és munkatársai (2008) által leírt módszer módosításával végeztük. A táptalaj felszínéről leszedett micéliumot egy éjszakán át 85 °C-on szárítókemencében szárítottuk. A szárítást követően a micéliumot porrá törtük és 0,5 grammnyi porhoz 2 ml extrakciós (25 %-os KOH oldat 2:3 etanol:metanol elegyben) puffert adtunk, majd 85 °C-on vízfürdőben 1 órát inkubáltuk. Ezt követően rendre 1 ml

desztillált vizet és 2 ml hexánt mértünk az elegyre. Három perc vortexelést követően a mintát 10 percig 3000 rpm-en centrifugáltuk. A felső, ergoszterint tartalmazó szerves fázist nitrogén gáz alatt beszárítottuk.

A minták részletes elemzése nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) történt. A vizsgálatok során Shimadzu grádiens HPLC kromatográfot használtunk, automata injektorral. A detektálás UV-VIS detektorral történt 280 nm-es hullámhosszon. A beszárított mintákat 1 ml metanolba oldottuk fel közvetlenül az analízis előtt, a mintákból 50 µl-t injektáltunk az analízishez. Az elválasztás Prodigy C-18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) oszlopon (Phenomenex) történt. Mobil fázisként víz: metanol 2:98 arányú elegyét alkalmaztuk, 1,2 ml/perc áramlási sebesség mellett. Standardként Sigma által forgalmazott ergoszterint használtunk.

4.3.10. Mikroszkópos vizsgálatok

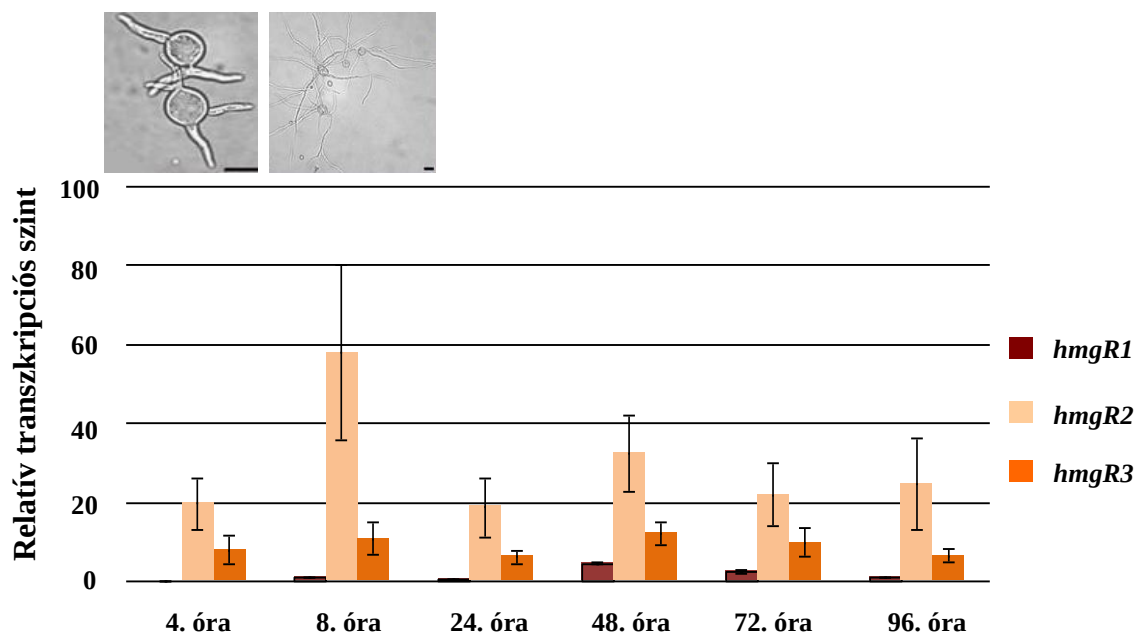
Fény és UV mikroszkópos felvételeket egy AxioCam ERc5S kamerával felszerelt Axiolab fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss) végeztük AxioVision 4.8 szoftver segítségével. Az apoptózis folyamatának vizsgálatához Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit-et (Sigma-Aldrich) használtunk a gyártó utasítása szerint. A morfológiai vizsgálatokhoz a törzseket 4 napig 25 °C-on YNB táptalajon (szükség szerint leucinnal és/vagy uracillal kiegészítve) növesztettük. Az Apoptosis Detection Kit használatához a törzseket 30 ml YNB tápoldatban növesztettük (10^5 spóra/ml) 25 °C-on és a leoltástól számított 6. órában festettük.

5. Eredmények, értékelés

5.1. A HMG-KoA reduktáz gének kifejeződése

5.1.1. A gének kifejeződése a tenyésztési idő alatt

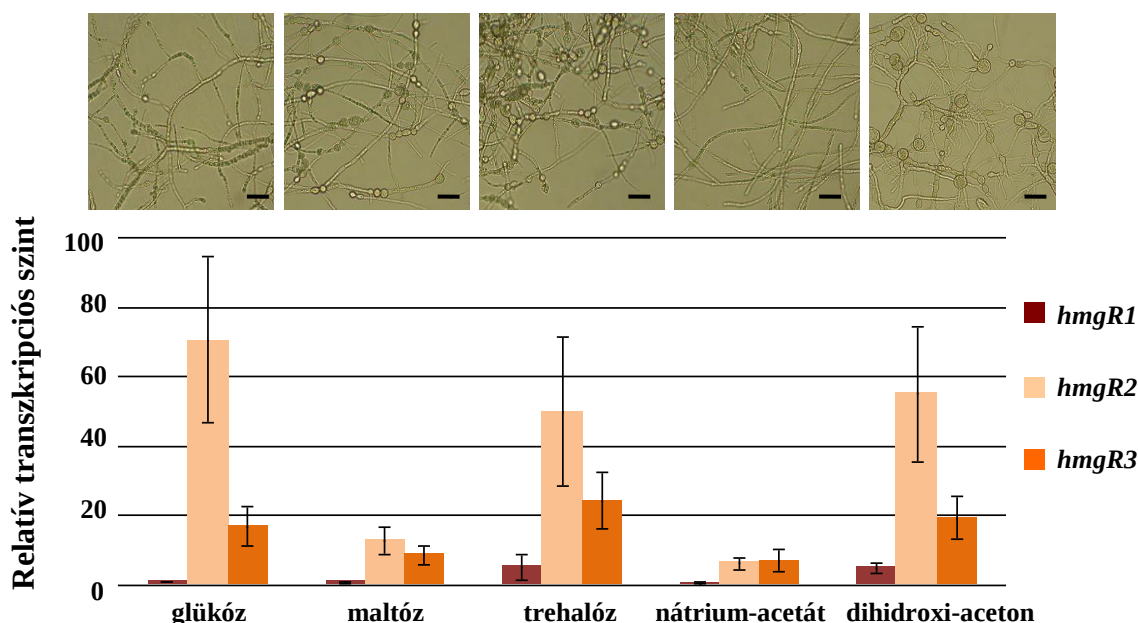
A *M. circinelloides* MS12 törzsénél a spórák csírázása a leoltástól számított 4. órában indul meg. A tenyésztési idő alatti génkifejeződés vizsgálatához azonos mennyiségű spórát oltottunk le folyadéktenyészetbe és szilárd táptalajra. A csírázó spórákat és az intenzíven meginduló micéliumokat folyadéktenyészetből, a későbbi időpontból származó micéliumot a szilárd táptalajról nyertük. A spórák csírázásának megindulásakor a *hmgR2* és *hmgR3* gén már kifejeződik különböző mértékben. A *hmgR1* gén transzkripciója később indul meg. A tenyésztés során végig a *hmgR2* gén relatív transzkripciós szintje volt a legmagasabb, maximumát a leoltástól számított 8. órában érte el. A *hmgR3* gén relatív transzkripciós szintje 48 óra elteltével volt a legmagasabb, de a *hmgR2* gén értékeit egyszer sem haladta meg. Ezzel szemben a *hmgR1* végig alacsony relatív transzkripciós szintet mutat, melynek maximuma a 48. órában volt. Az eredményeket a **4. ábra** mutatja. A fénymikroszkópos képeken a 4. órában csírázásnak indult spórák, illetve 8 óra elteltével a micéliumot képző sejtek láthatóak.



4. ábra. Az MS12 *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* géneinek relatív transzkripciós szintje a leoltás óta eltelt idő függvényében. Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket. A képek 4 és 8 óra elteltével mutatják a gombaspórák állapotát, illetve a hifaképződést. A méretarányt jelző vonalak értéke 10 mikron.

5.1.2. Különböző szénforrások hatása a gének kifejeződésére

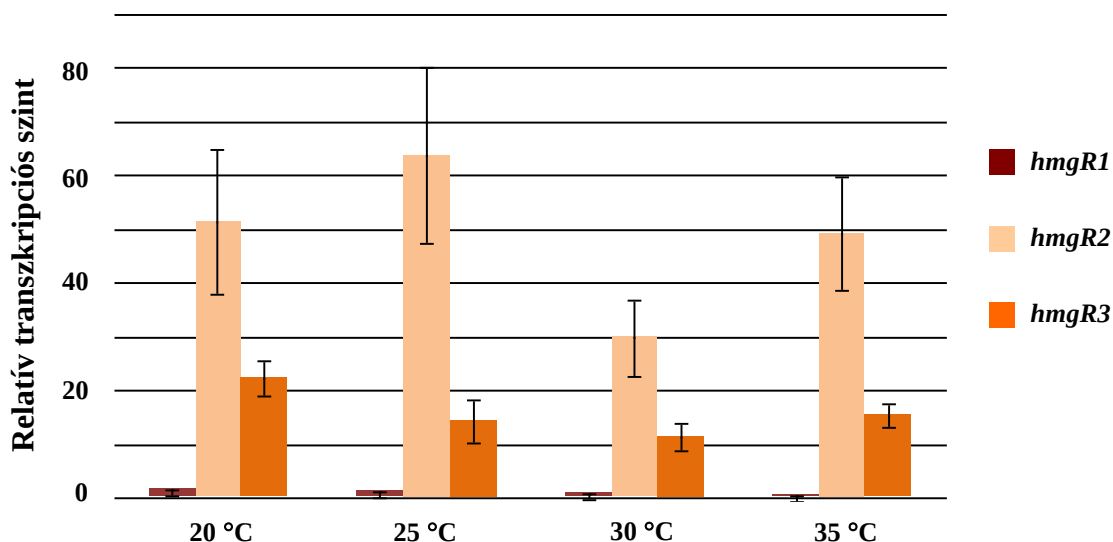
Az MS12 törzset leucinnal és uracillal kiegészített YNB táptalajon tenyésztettük. A vizsgálatokhoz a glükózt olyan szénforrásokra cseréltük, amelyekről a laborunkban előzőleg végzett kísérletek során kiderült, hogy kedvező hatással vannak a karotinoid-produkcióra. A felhasznált szénforrások a következők voltak: maltóz, trehalóz, nátrium-acetát és dihidroxi-aceton, valamint glükóz. A táptalaj az egyes szénforrásokat 1%-ban tartalmazta. A *hmgR2* gén relatív transzkripció szintje mindegyik szénforráson meghaladta a másik két gén szintjét. A *hmgR2* gén kifejeződése a glükózzal kiegészített táptalajon volt a legmagasabb, míg a többi szénforráson alacsonyabb relatív transzkripció szintet mutatott. Kimondottan igaz ez a maltózra és a Na-acetátra. A *hmgR1* és *hmgR3* kifejeződése viszont a trehalózzal kiegészített táptalajon volt magasabb a glükózzal és a többi szénforrással összehasonlítva. Az egyes szénforrások ezen kívül hatással voltak a hifák morfológiai megjelenésére is (5. ábra).



5. ábra. Különböző szénforrások hatása a *hmgR* gének expressziójára. Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket. Az RNS kivonás szilárd táptalajról származó micélumból származott, míg a morfológiai vizsgálatokhoz a törzset folyadék tenyészetben neveltük. A fénymikroszkópos képek mutatják a szénforrások hatását a hifák morfológiai megjelenésére. A méretarány jelző vonalak értéke 20 mikron.

5.1.3. A gének kifejeződése különböző hőmérsékleten

Az MS12 törzset 4 napig tenyésztettük YNB táptalajon 20, 25, 30 és 35 °C-on. A *hmgR2* gén 25 °C-on mutatta a legmagasabb aktivitást, 30 °C-on viszont jelentősen csökkent a transzkripciója. 35°C-on ismét erősebben expresszáldott. A *hmgR1* gén végig alacsony expressziós szintet mutatott és a *hmgR3* gén esetén sem tapasztaltunk nagyobb mértékű változást (6. ábra).

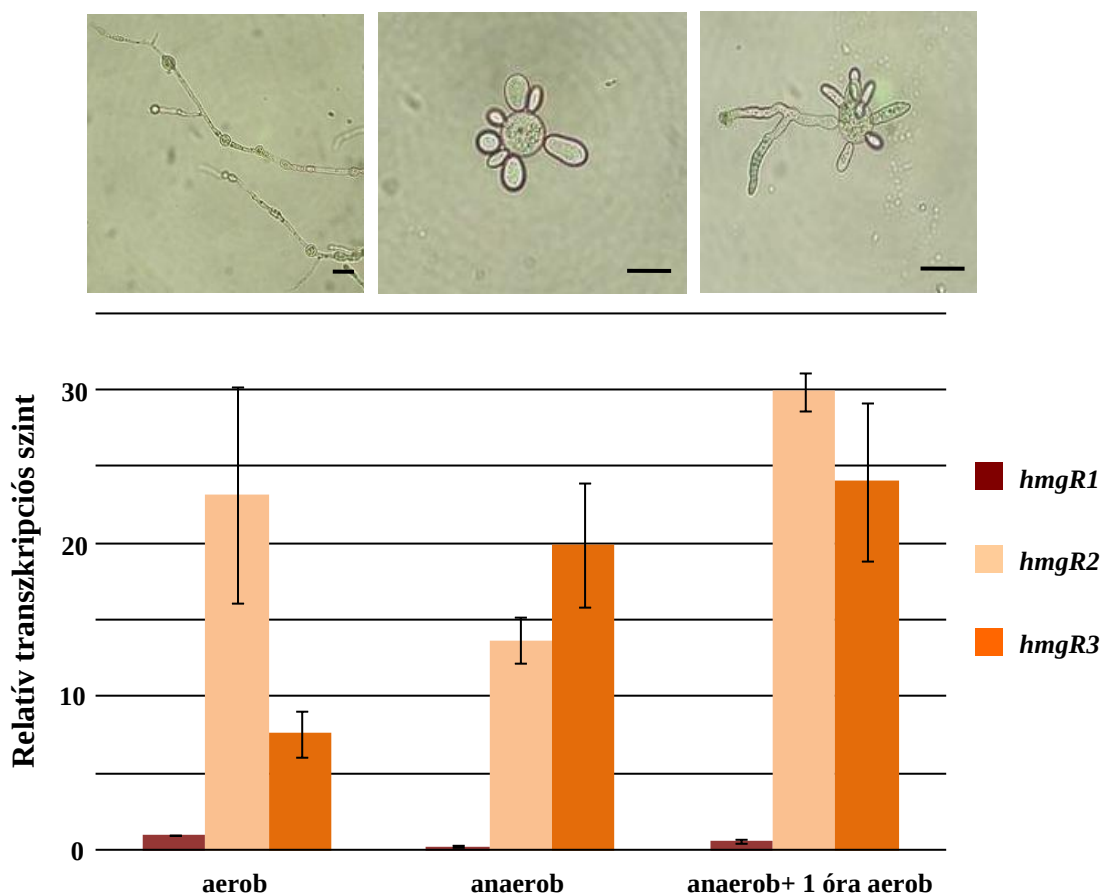


6. ábra. A *hmgR* gének relatív transzkripció szintje 20, 25, 30 és 35 °C-on nevelt tenyészet esetén. Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket.

5.1.4. A gének kifejeződése aerob és anaerob körülmények között

M. circinelloides-re jellemző a morfológiai dimorfizmus, vagyis hogy bizonyos, pl. anaerob, körülmények között élesztőszerű növekedésre képes. *S. cerevisiae*-ben megfigyelték, hogy anaerob körülmények között a *hmgR* gének expressziója megváltozik az aerob körülményekhez képest (Hampton és Rine 1994). Ezen eredmények ismeretében vizsgáltuk, hogy a gének milyen mértékben fejeződnek ki aerob és anaerob körülmények között tenyésztve a törzset. A leoltástól számított 4. napon végeztük el a transzkripció elemzéseket. Aerob körülmények között a *hmgR2* gén expresszáldott a legnagyobb mértékben, ebben az esetben normális fonális morfológiát figyeltünk meg. Anaerob környezetben nevelt tenyészetben a *hmgR3* gén mutatta a legnagyobb aktivitást, a *hmgR2* és *hmgR1* expressziója lecsökkent. Oxigéntől mentes környezetben a gomba élesztőszerű növekedést mutatott. Amikor anaerob körülmények között tenyésztettük a törzset és egy

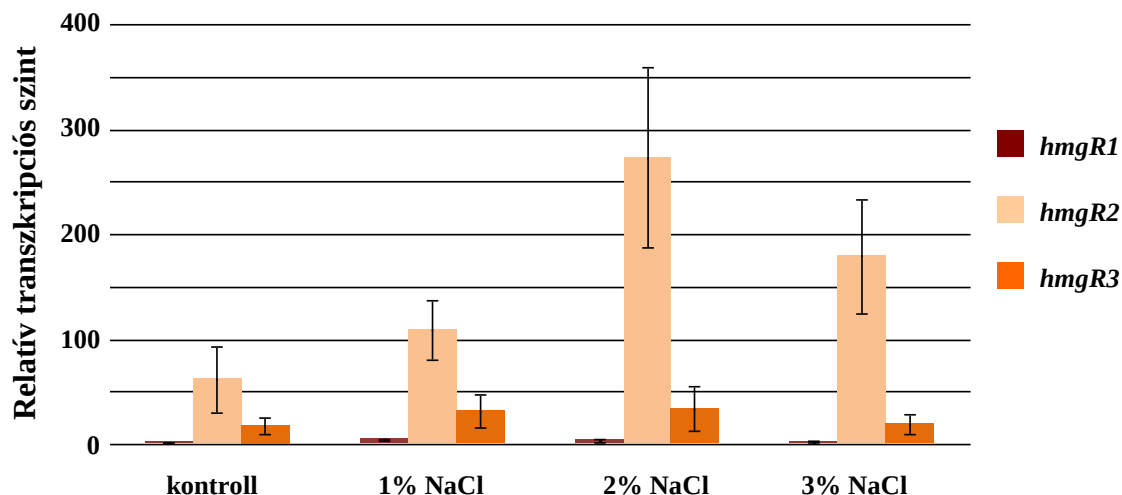
órára aerob környezetbe helyeztük, az élesztőszerű morfológiát mutató sejtek elkezdtek hifákat növesztetni és mindhárom gén expressziós szintje megnőtt. Ebben az esetben ismét a *hmgR2* gén expressziója volt a legmagasabb, viszont nem csökkent a *hmgR3* relatív transzkripció szintje (7. ábra).



7. ábra. Az MS12 *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* génjeinek relatív transzkripció szintje aerob, anaerob körülmények között, illetve anaerob majd egy órán át aerob körülmények között tenyésztve a törzset. Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket. A fénymikroszkópos képeken az aerob környezetben képződött hifák, az anaerob körülmények között fejlődő élesztőszerű sejtek és az anaerob tenyésztést követő aerob inkubálás hatására fejlődő hifák láthatóak. A méretarányjelző vonalak értéke 20 mikron.

5.1.5. Só stressz hatása a gének kifejeződésére

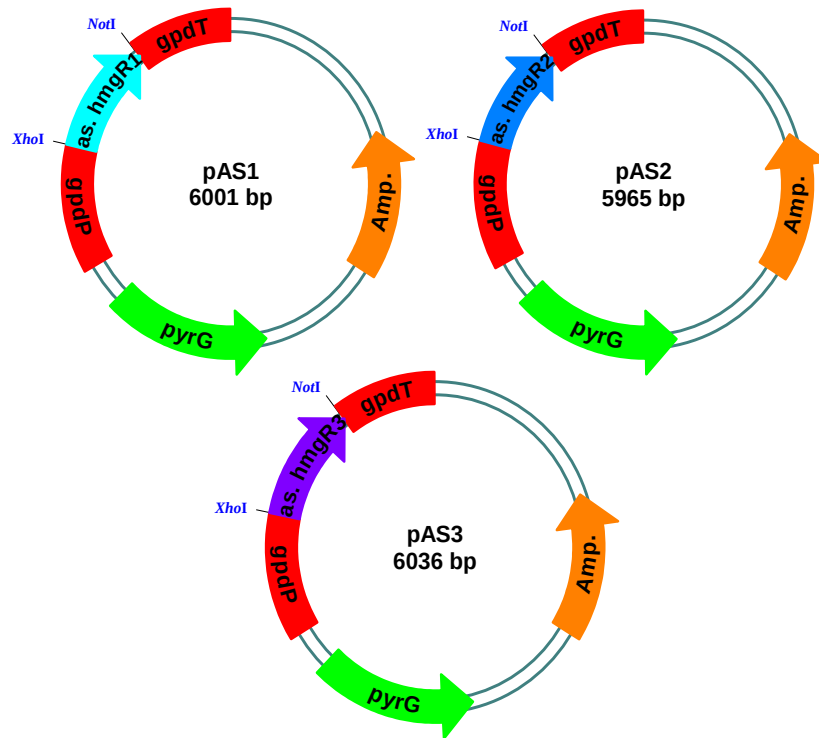
Az MS12 törzset 4 napig NaCl tartalmú YNB táptalajon tenyésztettük, amiben a NaCl koncentrációja 1%, 2% és 3% volt. A só stressz hatását a gének relatív transzkripciójára a 8. ábra mutatja. A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a só stressz a *hmgR1* és *hmgR3* relatív transzkripció szintjét nem befolyásolta számottevően, viszont a *hmgR2* relatív transzkripciója jelentősen megemelkedett 2%-os NaCl tartalom esetén.



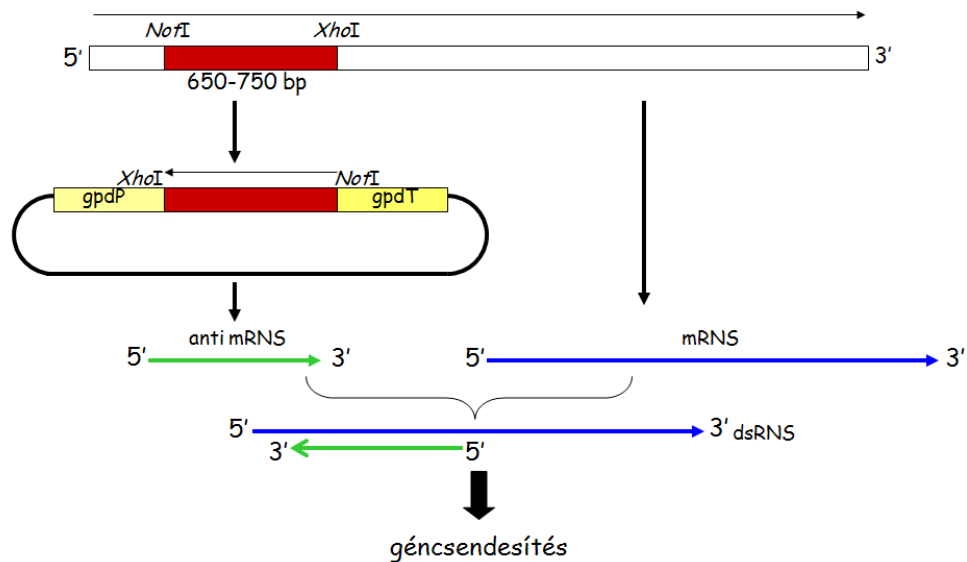
8. ábra. A gének relatív transzkripció szintje különböző sókoncentráció függvényében. A NaCl végkoncentrációja az egyes tápközegekben 1%, 2% és 3% volt. Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket.

5.2. A gének poszt-transzkripcionális csendesítése

A *hmgR* gének csendesítéséhez három vektort készítettünk. Ehhez mindhárom gén esetében a pPT81 plazmidot vettük alapul. A pPT81 tartalmaz egy ampicillin rezisztencia gént, amely a bakteriális transzformáció során biztosítja a szelekciót, továbbá a *Mucor pyrG* (orotidin-5-monofoszfát-dekarboxiláz) gént, amely az MS12-ben az uracil auxotrófiát komplementálja, ezzel biztosítva a gombatranszformálás során a szelekciót. A beépített génszakasz megfelelő kifejeződését a *Mucor* saját glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*gpd*) promótere és terminális régiója biztosítja. A bejuttatott génszakaszokat a *gpd* promóter és terminális szakaszok közé építettük be fordított orientációban, *NotI-XhoI* hasító helyek közé. A *hmgR1* esetében a csendesítéshez használt szakasz 661 bp (a *hmgR1* 5' végétől számított 29-630 nukleotid), a *hmgR2* esetében 625 bp (a gén 5' végétől számított 21-646 nukleotid), a *hmgR3* esetében pedig 697 bp (a gén 5' végétől számított 51-748 nukleotid) hosszú volt. A létrehozott vektoroknak a pAS1, pAS2 és a pAS3 nevet adtuk, ahol a számok jelzik, hogy az egyes plazmidok melyik génnek megfelelő génszakaszt tartalmazzák (**9. ábra**). A feltételezett géncsengesítés folyamatot a **10. ábra** mutatja.



9. ábra. A géncsendesítéshez épített plazmid konstrukciók.



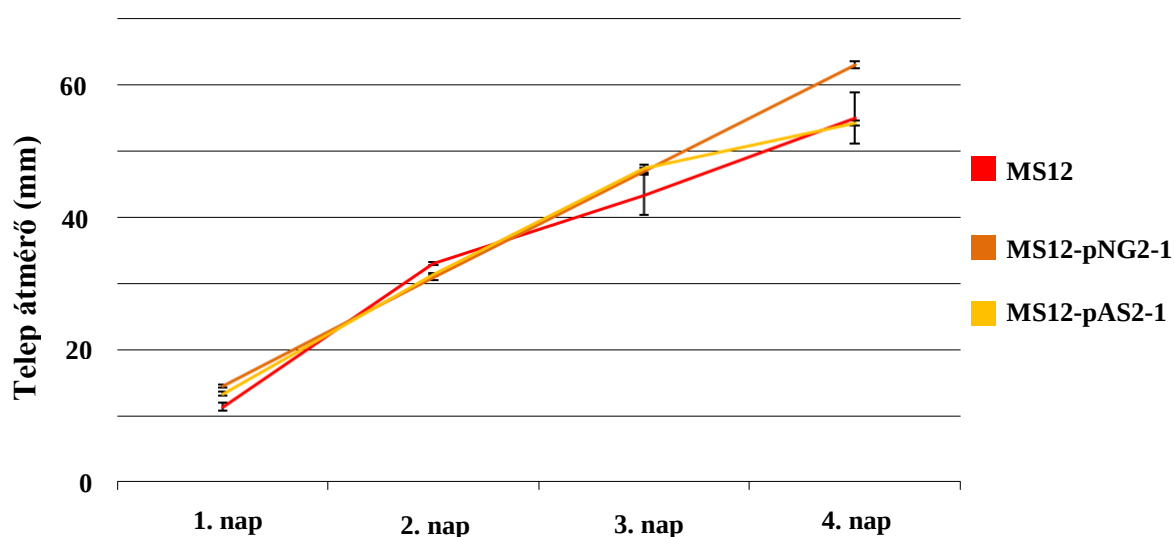
10. ábra. Az antiszensz RNS alapú géncsendesítés folyamata. A plazmidokon található génszakaszokról átíródó RNS komplementer az egyes génekről átíródó mRNS-ek egy-egy szakaszával. Ezek képesek duplexeket képezni, és ennek következtében a sejt degradálja ezt a dsRNS-t, megvalósítva ezáltal a géncsendesítést.

MS12 törzsbe (*pyrG⁻*, *leuA⁻* mutáns) PEG-mediált protoplaszt transzformációval juttattuk be a plazmidokat és leucinnal kiegészített YNB táptalajon szelektáltunk a transzformánsokra. Mindhárom gén esetében több transzformáns telepet kaptunk, melyeknek az MS12-pAS1, MS12-pAS2 és MS12-pAS3 neveket adtuk a telep számával kiegészítve.

A kapott telepeket leucinnal kiegészített YNB táptalajra oltottuk tovább, a szelekciós körülményeket fenntartva, hogy a bejuttatott cirkuláris plazmidokat a sejtek megtartsák. Megkezdtük a kapott transzformánsok jellemzését, összehasonlítva azokat a korábban a laborban előállított túlműködtetett mutánsokkal. A transzformánsok közül egyet-egyet választottunk ki és azokkal kezdtük meg a vizsgálatokat.

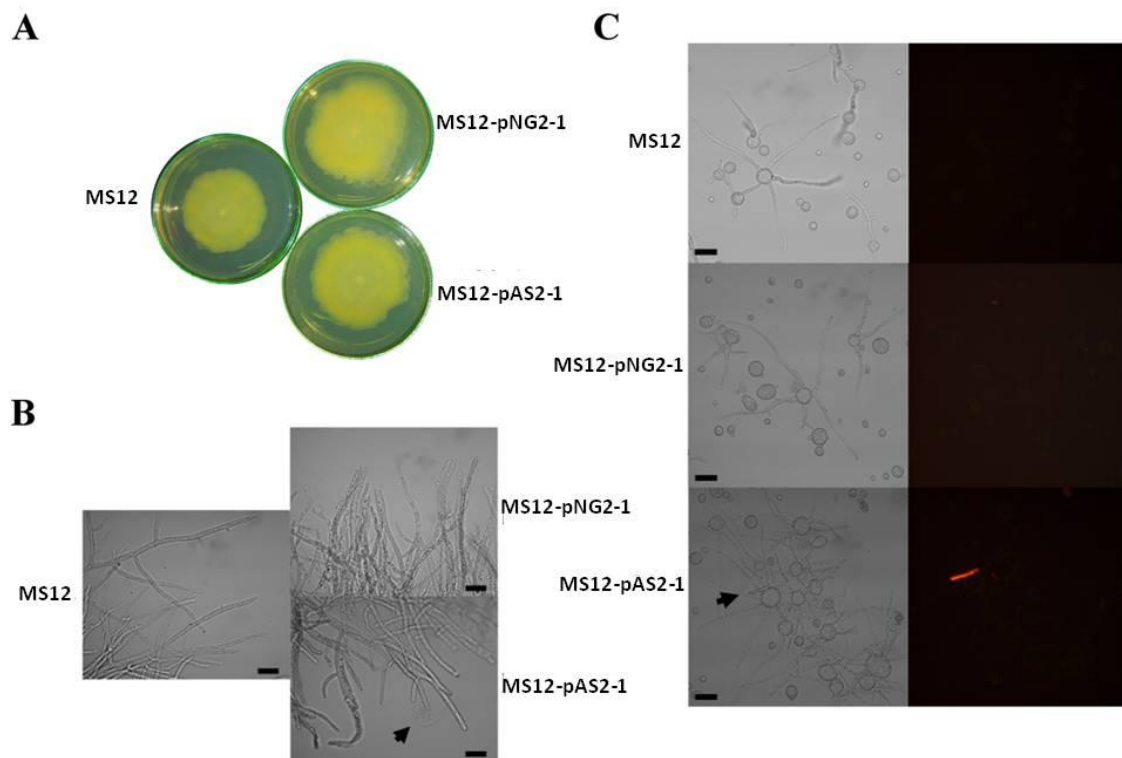
A makro- és mikromorfológiai vizsgálatokhoz YNB táptalaj közepére oltottunk 20 μ l spóraszuszpenziót, mely 10^5 spórát tartalmazott. A csészéket 4 napon keresztül 25 °C-on inkubáltuk és naponta mértük a telepek átmérőjét és ellenőriztük makromorfológiájukat. A vizsgálatokhoz 3 párhuzamosan leoltott csészét használtunk. A mikromorfológiai vizsgálatokat a 4. nap után végeztük a telepek széléről vett minták segítségével.

Az MS12-pNG2-1 és MS12-pAS2-1 transzformánsok a növekedés ütemében nem jelentkeztett jelentős különbség az MS12-höz képest (**11. ábra**).



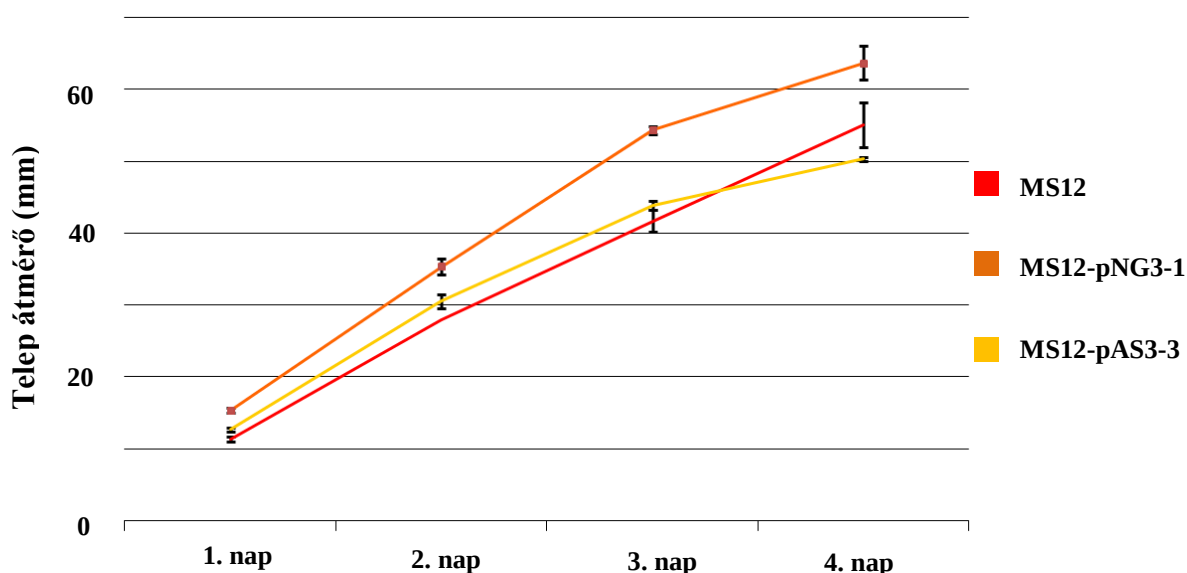
11. ábra. Az ábra az MS12, az MS12-pAS2-1 transzformáns, valamint a laborunkban előzőleg létrehozott MS12-pNG2-1 túlműködtetett mutáns növekedésének ütemét mutatja az idő függvényében. Az eredményeket három független mérésből kaptuk, a szórás mutatja a mérések közti eltéréseket.

A *hmgR2* gén csendesítése és túlműködtetése során nem jelentkezett jelentősebb változás a telepek makromorfológiájában az MS12-höz képest (**12. A ábra**). A fénymikroszkópos vizsgálatok során a végálló hifák mikromorfológiája sem változott jelentősen a vad típusú törzshöz képest, bár a pAS2 vektort hordozó csendesített mutáns esetében itt-ott plazmakiáramlásokat tapasztaltunk. (**12. B ábra**). Egyes regulátor, illetve apoptotikus folyamatokban szerepet játszó fehérjék, pl. a Ras proteinek, funkciós csoportjai az izoprén bioszintézis úton képződnek. Az irodalmi adatokat és az általunk tapasztalt plazmakifolyásokat figyelembe véve megvizsgáltuk a korai és kései apoptotikus folyamatok jelenlétét. Sem az MS12-nél sem a *hmgR2* túlműködtetett mutánsnál nem találtunk az apoptózisra utaló, zölden festődő, illetve a nekrosisra utaló pirosan festődő sejteket. A csendesített mutánsnál nagyon kis gyakorisággal, de találtunk nekrotikus hifákat (**12. C ábra**). Megvizsgálva a spórák csírázó képességét azt tapasztaltuk, hogy sem a *hmgR2* gén túlműködtetése, sem a csendesítése nincs kihatással a spórák csírázó képességére.

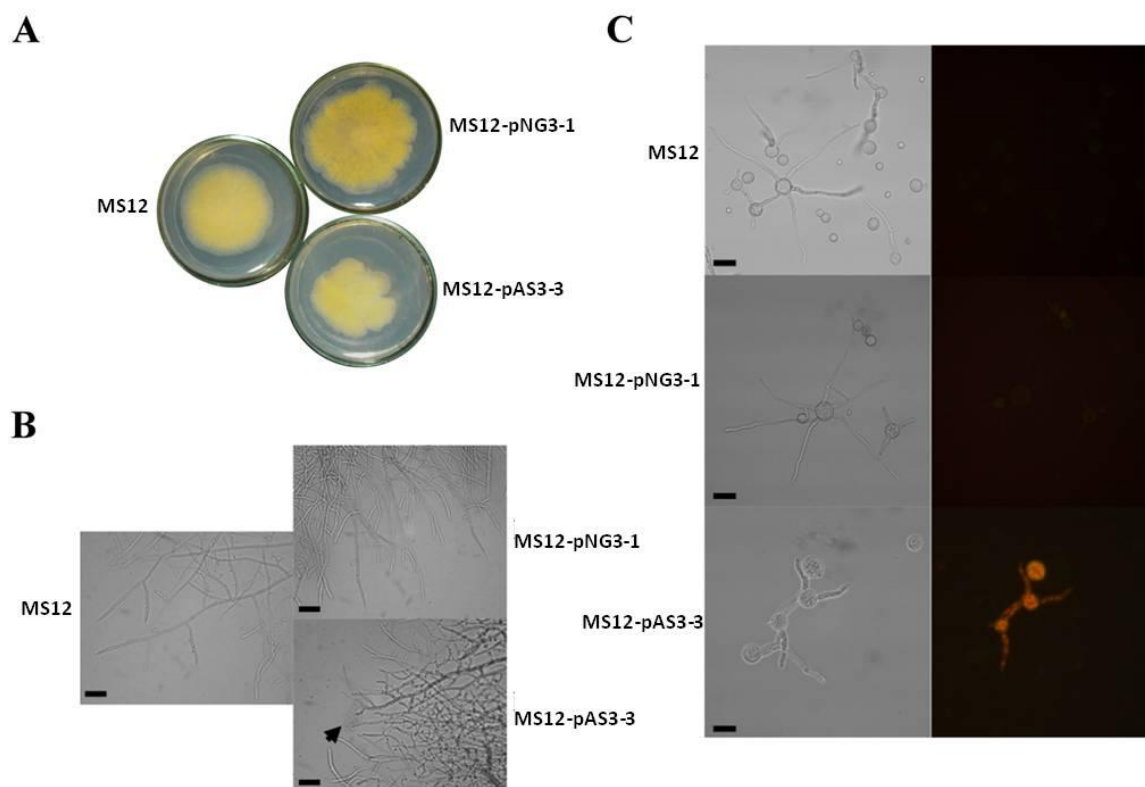


12. ábra. Az ábra a pAS2 plazmid hatását mutatja az MS12 törzshöz illetve a *hmgR2* gént plusz kópiában hordozó MS12-pNG2-1 mutánshoz viszonyítva. A transzformánsok a leoltás után 4 nappal az MS12 törzshöz és a túlműködtetett transzformánshoz képest nem mutattak makromorfológiai elváltozásokat (**A**). A hifák megjelenésében sem mutatkozott jelentős különbség, a nyíl az MS12-pAS2-1 transzformánsnál tapasztalt plazmakiáramlást jelzi (**B**). A fluoreszcens mikroszkópos felvételeken látható, hogy a *hmgR2* gén csendesítése nem okozott nagymértékű változásokat az apoptotikus folyamatokban (**C**). A méretarányt jelző vonalak értéke 20 μm .

A *hmgR3* gént plusz kópiában hordozó transzformáns növekedési üteme a tenyésztési idő alatt végig meghaladta az MS12 törzs növekedését. A csendesített mutáns esetében a telep növekedése a 3. naptól kezdődően lassul (**13. ábra**) és a telep morfológiája megváltozik (**14. A ábra**). A telep alakja szabálytalanná válik és a telepen világosabb sárga és sötétebb sárga szektorok jelentkeznek (**14. A ábra**). Megvizsgálva a transzformánsok spóráinak csírázókéességét, arra a megállapításra jutottunk, hogy a csendesített mutánsok spóráinak csírázása kitolódik a 4. órától a 6-8. óráig. A túlműködtetett mutánsoknál ilyen fiziológiai változást nem tapasztaltunk. Vizsgálva a törzsek mikromorfológiáját azt tapasztaltuk, hogy a csendesített mutáns végálló hifái megváltoztak. Az elágazások gyakorisága megnőtt, a hifák megvastagodtak és a végükön helyenként plazmakiáramlásokat figyeltünk meg (**14. B ábra**). Mindez a morfogenezis zavarára és/vagy a hifák pusztulására utal. Az apoptózis detektáló kittel végzett kísérlet eredménye a **14. C ábrán** látható. Az MS12-pAS3-3 transzformánsnál egyértelműen láthatóak az apoptózisra jellemzően festődő sejtek. Sem az MS12-nél, sem a túlműködtetett mutánsnál nem tapasztaltunk hasonló festődést mutató sejteket. A pAS3-as vektort hordozó transzformánsnál, összehasonlítva a pAS2-t hordozó transzformánssal, fokozottabb sejtelhalást tapasztaltunk. Az MS12-pAS2-1 esetében sem tapasztaltunk az MS12-pAS3-3 transzformánsokhoz hasonló morfológiai elváltozásokat.



13. ábra. Az ábra az MS12, az MS12-pAS3-3 transzformáns, valamint a laborunkban előzőleg létrehozott MS12-pNG3-1 túlműködtetett mutáns növekedésének ütemét mutatja az idő függvényében. Az eredményeket három független mérésből kaptuk, a szórás mutatja a mérések közti eltéréseket.



14. ábra. Az ábra a pAS3 plazmid hatását mutatja az MS12 törzshöz illetve a *hmgR3* gént extra kópiában hordozó MS12-pNG3-1 mutánsához viszonyítva. A transzformánsok a leoltás után 4 nappal az MS12 törzshöz és a túlműködtetett transzformánsokhoz képest kisebb telepet képeztek és a szabálytalan telepmorfológia is egyértelműen látható (A). A hifák megjelenésében is különbség mutatkozott (B), a nyíl az MS12-pAS3-3 transzformánsnál tapasztalt plazmakifolyást jelzi. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeken az annexin V kezelés után láthatóvá váltak a nekrotikus és apoptotikus sejtek (C). A méretarányt jelző vonalak értéke 20 μm .

2. táblázat. Az MS12 és a transzformánsok által termelt ergoszterin mennyisége.

Törzs	Ergoszterin mennyiség (mg/g szárazanyag)	Szórás
MS12	5,5	$\pm 0,8$
MS12-pNG2-1	7,1	$\pm 0,6$
MS12-pAS2-1	4,1	$\pm 0,09$
MS12-pNG3-1	6	$\pm 2,1$
MS12-pAS3-3	2,97	$\pm 0,31$

Az egyes transzformánsok ergoszterin tartalmát a **2. táblázat** tartalmazza, melyből kiderül, hogy a *hmgR2* és *hmgR3* túlműködtetése során az ergoszterin mennyisége megnő.

Ez a növekedés a *hmgR2* gén túlműködtetése esetében különösen szembetűnő. A táblázatból az is látszik, hogy a *hmgR3* gén csendesítése során az ergoszterin mennyisége jelentősen lecsökken. A mérések két párhuzamos tenyésztés eredményeit ábrázolják.

A transzformánsok további jellemzése folyamatban van, vizsgáljuk a géncsendesítés hatásait a karotinoid produkcióra, a sztatin érzékenységre és egyéb élettani folyamatokra. Ezen kívül folyamatban van az *hmgR1* csendesített és túlműködtetett mutánsok jellemzése is.

Az eddigi eredményeink azt mutatják, hogy mindhárom gén kifejeződik. Aerob körülmények között a *hmgR2* expresszálódik legerőteljesebben és elsődleges szerepet tölt be az izoprén bioszintézisben, és az aerob körülmények között környezeti változásokra adott válaszokban. Anaerob körülmények között a *hmgR3* expresszálódik a legerőteljesebben. Ezen kívül a *hmgR3* valószínűleg kiemelt szerepet tölt be a morfogenezisben és jelentős hatással bír az apoptotikus folyamatokra is.

6. Összefoglalás

Munkánk során a *M. circinelloides* járomspórás gomba *hmgR* génjeit vizsgáltuk. A fő célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk a gének kifejeződését különböző feltételek mellett. Ezen kívül olyan vektorkonstrukciók építése volt a célunk, amelyekkel lehetővé válik a *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* gének poszt-transzkripcionális csendesítése.

Megvizsgáltuk, hogy a gének milyen mértékben fejeződnek ki a tenyésztési idő alatt a spórák csírázásától kezdődően. Azt tapasztaltuk, hogy a csírázás megindulásakor mindhárom gén aktív, de a kifejeződésük mértéke eltérő. A tenyésztés során aerob körülmények közt végig a *hmgR2* gén transzkripció szintje volt a legmagasabb. Vizsgáltuk a gének kifejeződését 20, 25, 30 és 35 °C-on. Minden esetben a *hmgR2* mutatta a legmagasabb értékeket, maximumát 25°C-on érte el. A só stressz vizsgálata során azt az eredményt kaptuk, hogy 2%-os NaCl koncentráció esetén a *hmgR2* gén transzkripciója erőteljesen megnőtt, míg a másik két génre csak minimális hatása volt. Különböző szénforrások hatását is vizsgáltuk. Glükózt, maltózt, trehalózt, nátrium-acetátot és dihidroxi-acetont alkalmaztunk a kísérletek során. A *hmgR2* gén glükóz esetében mutatta a legmagasabb aktivitást, a másik két gén ennél végig alacsonyabb szinten működött. Maltózon és nátrium-acetáton mindhárom gén transzkripció szintje alacsony volt. Ezen kívül megvizsgáltuk, hogy az aerob és anaerob körülmények milyen hatást gyakorolnak a három gén aktivitására. Aerob körülmények között a *hmgR2* működött a legintenzívebben, míg anaerob körülmények között azt tapasztaltuk, hogy a *hmgR3* gén transzkripciója erőteljesen megnőtt, a *hmgR2* aktivitása pedig visszaesett. A *hmgR1* minden kísérlet során alacsony aktivitást mutatott.

Kísérleti munkánk másik részében géncsendesített mutánsokat hoztunk létre mindhárom génre. A *hmgR3* csendesítése során szembetűnő morfológiai változásokat tapasztaltunk a kontroll MS12 törzshöz képest. A spórák csírázásának kezdete kitolódott, a gomba lassabb ütemű növekedést mutatott, és a szabálytalan alakú telepet képzett.

Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy mind a három gén kifejeződik, és valószínűleg a *hmgR2* az, amely aerob körülmények közt az általános izoprén bioszintézisben elsődleges szerepet játszik, míg a *hmgR3* anaerob körülmények közt erőteljesen expresszálódik, valamint fontos szerepet játszik a morfogenezisben.

További kísérleti céljaink közé tartozik a csendesített mutánsok molekuláris és genetikai vizsgálata, valamint a gének szabályozásának feltárása.

7. Irodalomjegyzék

ALCAZAR-FUOLI, L., MELLADO, E., GARCIA-EFFRON, G., LOPEZ, J. F., GRIMALT, J. O., CUENCA-ESTRELLA, J. M. and RODRIGUEZ-TUDELA, J., L. (2008) Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* 73: 339-347.

AGARWALL, B., HENDWALL, S. B., HALMOS, B., MOSS, S. F., RAMEY, W. G. and HOLT, P. R. (1999) Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 5: 2223-2229.

BURMESTER, A. and CZEMPINSKI, K. (1993) Sequence comparison of a segment of the gene for 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase in zygomycetes. *Eur. J. Biochem.* 220: 403-408.

BASSON, M. E., MOORE, R. L., O'REAR, J. and RINE, J. (1987) Identifying mutations in duplicated functions in *Saccharomyces cerevisiae*: Recessive mutations in HMG-CoA reductase genes. *Genetics Society of America* 117: 645-655.

BASSON, M. E., THORSNESS, M. and RINE, J. (1986) *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5563-5567.

BASSON, M. E., THORSNESS, M., FINER-MOORE, J., STROUD, R. M. and RINE, J. (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3797-3808.

BIDLE, K. A., HANSON, T. E., HOWEL, K. and NANNEN, J. (2007) HMG-CoA reductase is regulated by salinity at the level of transcription in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* 11: 49-55.

BREITLING, R. and KRISANS, S. K. (2002) A second gene for peroxisomal HMG-CoA reductase? A genomic reassessment. *Journal of Lipid Research* 43: 2031-2036.

BROWN, M. S. and GOLDSTEIN, J. L. (1980) Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *Journal of Lipid Research* 21: 505-517.

- CAELLES, C., FERRER, A., BALCELLS, L., HEGARDT, F. G. and BORONAT, A. (1989) Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol. Biol.* 13: 627-638.
- CHIN, D. J., GREGORIO, G., RUSSEL, D. W., LISCUM, L., LUSKEY, K. L., BASU, S. K., OKAYAMA, H., BERG, P., GOLDSTEIN, J. L. and BROWN, M. S. (1984) Nucleotide sequence of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, a glycoprotein of endoplasmatic reticulum. *Nature* 308: 613-617.
- CORROCHANO, L. M., AVALOS, J. (1992) Cloning a segment of the gene encoding 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase in *Phycomyces blakesleeanus* and *Gibberella fujikuroi* by the polymerase chain reaction. *Exp. Mycol.* 16: 167-171.
- CSERNETICS, A., NAGY, G., ITURRIAGA, E. A., SZEKERES, A., ESLAVA, A.P., VÁGVÖLGYI, C., PAPP, T. (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet Biol.* 48 (7): 696-703.
- FRIESEN, J., A. and RODWELL V., W. (2004) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biology* 5: 248.
- GERTLER, F. B., CHIU, C.-Y., RICHTER-MANN, L. and CHIN, D. J. (1988) Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2713-2721.
- HAMPTON, R. Y. and RINE, J. (1994) Regulated of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *The Journal of Cell Biology* 125: 299-312.
- JOO, J. H. and JETTEN, A. M. (2010) Molecular mechanism involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer letters* 287 (2): 123-135.
- KONING, A. J., ROBERTS, C. J. and WRIGHT, R. L. (1996) Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. *Molecular Biology of the Cell* 7: 769-789.

- LEIVAR, P., GONZÁLES. V. M., CASTEL, S., TRELEASE, R. N., LÓPEZ-IGLESIAS, C., ARRÓ, M., BORONAT, A., CAMPOS, N., FERRER, A. and FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X. (2005) Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiology* 137: 57-69.
- LOFTUS, S. K., MORRIS, J. A., CARSTEADT, E. D., GU, J. Z., CUMMINGS, C., BROWN, A., ELLISON, J., OHNO, K., ROSENFELD, M. A, TAGLE, D. A., PENTCHEV, P. G. and PAVAN, W. J. (1997) Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277 (5323): 180-181.
- LUKÁCS, GY., PAPP, T., SOMOGYVÁRI, F., CSERNETICS, Á., NYILASI, I. and VÁGVÖLGYI, CS. (2008) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. *Ant Leeuwenhoek* DOI 10.1007/s10482-008-9287-2
- MOORE, K. B. and OISHI, K. K. (1993) Characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity during maize seed development, germination, and seedling emergence. *Plant Physiology* 101: 485-491.
- ROZE, L. V. and LINZ, J. E. (1998) Lovastatin triggers an apoptosis-like death process in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Genet Biol.* 25: 119-133.
- RUIZ-ALBERT, J., CERDA-OLMEDO, E. and CORROCHANO, L. M. (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Mol Genet Genomics.* 266 (5): 768-777.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York
- SEONG, K., LI, L., HOU, Z., MILES, T., KISTLER, H. C. and XU, J. (2006) Cryptic promoter activity in the coding region of the HMG-CoA reductase gene in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 34-41.
- SHIRTLIFF, M. A., KROM, B. P., MEIJERING, R. A. M., PETERS, B. M., ZHU, J., SCHEPER, M. A., HARRIS, M. L. and JABRA-RIZK, M. A. (2009) Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother* 53 (6): 2392-2401.
- STERMER, B. A., BIANCHINI, G. M. and KORTH, K. L. (1994) Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *Journal of Lipids Research* 35: 1133-1140.

VAUPOTIC, T. and PLEMENITAS, A. (2007) Osmoadaptation-dependent activity of microsomal HMG-CoA reductase in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* is regulated by ubiquitination. *Febs Letters* 581: 3391-3395.

VAUPOTIČ, T., VERANIC, P., PETROVIČ, U., GUNDE-CIMERMAN, N. and PLEMENITAŠ, A. (2008) HMG-CoA reductase is regulated by environmental salinity and its activity is essential for halotolerance in halophilic fungi. *Studies in Mycology* 61: 61-66.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Vágvölgyi Csabának, az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette munkámat a tanszéken.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Papp Tamásnak szakmai tanácsaiért és áldozatos munkájáért, mellyel segítette jelen dolgozat elkészítését.

Külön köszönet illeti Nagy Gábort a munkámban nyújtott hasznos szakmai tanácsokért és gyakorlati segítségért.

Valamint köszönettel tartozom az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék 309-es labor dolgozóinak, valamint a tanszék összes dolgozójának.

9. Nyilatkozat

Alulírott, Farkas Anita, Biológus M.Sc. szakos hallgató kijelentem, hogy TDK dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

A dolgozatban leírt munkafolyamatok közül

- a kompetens *Escherichia coli* sejt készítést,
- a baktérium transzformációt,
- az agaróz gélelektroforézist,
- a protoplaszt készítést,
- a protoplasztok transzformációját,
- a plazmid tisztítást,
- a kvantitatív valós idejű PCR (qPCR) kísérleteket,
- a gének csendesítését,
- az ergoszterin kivonást
- a mikroszkópos vizsgálatokat végeztem el.

Farkas Anita

Szeged, 2012. 11. 05.