

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék
Biológus szak

XXXII. OTDK Biológia Szekció
TDK DOLGOZAT

***A Mucor circinelloides* HMG-KoA redukáz enzimeinek
sejten belüli lokalizációja**

Páll Orsolya
Biológus MSc, II. évfolyam

Témavezető:
Dr. Papp Tamás, egyetemi docens

2014
Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETŐ	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Az izoprenoid vegyületek szintézise és szerepe	3
2.2. A HMG-KoA reduktáz	3
2.3. A HMG-KoA reduktáz lokalizációja.....	4
2.4. A HMG-KoA reduktázok funkciója	6
2.5. A <i>Mucor circinelloides</i> -ben található HMG-KoA reduktázok jellemzése	8
3. CÉLKITŰZÉSEK	10
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
4.1. A kísérletek során felhasznált törzsek	11
4.2. A kísérletek során használt tápoldatok és táptalajok	11
4.3. Tenyésztési körülmények	11
4.4. Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek.....	12
4.4.1. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek készítéséhez felhasznált oldatok	12
4.4.2. <i>E. coli</i> sejtek transzformációjához felhasznált oldatok.....	12
4.4.3. Gélelektroforézishez használt anyagok	12
4.4.4. Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok	12
4.4.5. Mitokondrium festéshez használt reagens	12
4.4.6. Endoplazmás retikulum festéshez használt reagens	12
4.5. Primerek	13
4.6. A kísérleti munka során előállított (pH1cGFP, pH2cGFP és pH3cGFP) vektorkonstrukciók építéséhez használt plazmidok	13
4.7. Vizsgálati módszerek.....	14
4.7.1. Genomi DNS kivonása <i>M. circinelloides</i> -ből.....	14
4.7.2. RNS tisztítása <i>M. circinelloides</i> -ből	14
4.7.3. DNS gélelektroforézis.....	14
4.7.4. DNS visszaizolálása agaróz gélből	14
4.7.5. A <i>gfp</i> gén amplifikálásához használt reakciókörülmények	14
4.7.6. Restrikciós emésztések, ligálás, plazmidok építése és plazmid DNS tisztítása..	15
4.7.7. Kompetens <i>E.coli</i> sejtek készítése	15
4.7.8. Baktérium transzformáció.....	16
4.7.9. Protoplasztképzés.....	16
4.7.10. A protoplasztok transzformációja	16
4.7.11. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok	17
4.7.12. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok	17
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	18
5.1. A fúziós fehérjék létrehozásához szükséges vektorkonstrukciók megépítése.....	18
5.2. A transzformánsok vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával	19
5.3. Kolokalizációs vizsgálatok az endoplazmatikus retikulummal és mitokondriummal..	22
6. ÖSSZEFOGLALÁS	26

1. BEVEZETŐ

A *Mucor circinelloides* a Mucoromycotina csoport, Mucorales rendjébe tartozó karotin termelő fonalas gomba. A jól kidolgozott genetikai transzformációs rendszerének és a morfológiai dimorfizmusának köszönhetően modellorganizmusként használják számos genetikai, biokémiai és molekuláris biológiai kutatásban. Az egyes izoprén származékok bioszintézise az acetát-mevalonát útvonalon keresztül zajlik, melynek központi lépése a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) átalakulása mevalonsavvá. Ezt az átalakulást a HMG-KoA reduktáz enzim katalizálja. A HMG-KoA reduktázt kódoló gének és a róluk átiródó fehérjék szerkezetét és funkcióját már számos organizmusban leírták és vizsgálták. A szakirodalomból ismert, hogy a különböző élőlényekben az enzimet kódoló gének száma, sejten belüli lokalizációja és szabályozása eltérő lehet.

A *M. circinelloides* genomja három HMG-KoA reduktáz gént (*hmgR1*, *hmgR2*, *hmgR3*) kódol, melyeket korábban a laborunkban izoláltak és funkcionális elemzésüket megkezdték. Vizsgálták az egyes gének kópiaszám emelésének, valamint antiszensz RNS (asRNS) technikával megvalósított csendesítésének hatását a gomba karotin és ergoszterin termelésére. Továbbá megvizsgálták a gének kifejeződését különböző tenyésztési körülmények között valós idejű kvantitatív reverz transzkripció PCR segítségével. Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy az egyes HMG-KoA reduktázok eltérő mértékben vesznek részt a karotin és ergoszterol bioszintézis folyamatában, különbözőképpen hatnak a gomba növekedésére és morfológiájára, emellett a környezeti hatásokhoz való alkalmazkodásban játszott szerepük is eltérő.

Célul tűztük ki a HMG-KoA reduktázok intracelluláris lokalizációjának vizsgálatát, melyhez zöld fluoreszcens fehérje gén (*gfp*) segítségével fúziós fehérjéket hoztunk létre. A létrehozott fúziós fehérjéket expressziós vektorok segítségével kifejeztettük *M. circinelloides*-ben, majd vizsgáltuk azok sejten belüli lokalizációját fluoreszcens és konfokális mikroszkóp segítségével. A különböző élőlényekben a HMG-KoA reduktázok az endoplazmás retikulum membránjához kötődnek, de előfordulhatnak a mitokondriumban, peroxiszómában és egyéb kompartmentekben is. Munkánk második felében a fúziós fehérjéket kifejező transzformánsok endoplazmás retikulumát és mitokondriumát specifikus fluoreszcens festékek segítségével festve vizsgáltuk és ennek fényében elemeztük azok GFP-vel mutatott kolokalizációját.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az izoprenoid vegyületek szintézise és szerepe

Az izoprenoidok a biológiai vegyületek egyik legváltozatosabb csoportját alkotják, amelyek izopentenil-pirofoszfát (IPP) és dimetilallil-pirofoszfát (DMPP) kondenzációjával jönnek létre. Az izoprenoid prekursorok két független úton keletkezhetnek. A legtöbb eukariótában és az archeákban az úgynevezett acetát-mevalonát útvonal van jelen, melynek központi lépése a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) átalakulása mevalonsavvá. Ezt a lépést a HMG-KoA reduktáz katalizálja. Növényekben és baktériumokban az acetát-mevalonát útvonaltól független metileritriol-4-foszfát (MEP) útvonal is megtalálható, melyben piruvátból és gliceraldehid-3-foszfátból kiindulva alakul ki az IPP (Lombard és Moreira, 2011). Az IPP alegységek kondenzációjából származó köztitermékek a terpének további, specifikus szintézisútjainak prekursorait képezik. A 10 szénatomos geranil-pirofoszfátból (GPP) a monoterpének, a 15 szénatomból álló farnezil pirofoszfátból (FPP) a szeszkviterpének, triterpének és szterinek, míg egy újabb IPP kapcsolódásával keletkező 20 szénatomos geranil-geranil pirofoszfátból (GGPP) a diterpének és karotinoidok keletkeznek. Az egyes izoprén vegyületek széleskörű biológiai funkcióval rendelkezhetnek. Lehetnek sejtmembrán alkotók (pl. koleszterin, ergoszterin), hormonok (pl. gibberelinek, szteroidok), pigmentek (pl. karotinoidok), az elektron transzport lánc elemei (pl. kinonok), emellett egyes fehérjék funkciós csoportját is adhatják (farnezil illetve geranilgeranil csoport), valamint apoptotikus folyamatokban is részt vehetnek (pl. Ras fehérjék prenil csoportjaiként) (Lombard és Moreira, 2010; Hedl és mtsai., 2004).

2.2. A HMG-KoA reduktáz

A HMG-KoA reduktáz egy NAD(P)H kofaktorrall működő oxidoreduktáz (Hedl és mtsai., 2004). A HMG-KoA reduktáz aminosav szekvenciája alapján végzett filogenetikai elemzések alapján az enzimnek két osztályát különítették el. Az I-es osztályba sorolhatóak az eukarióták, az archeák, néhány proteo- és aktinobaktérium csoport, míg a II-es osztályba az eubaktériumok és egyes archeák enzimeit. Az I-es osztályba tartozó reduktázok esetén három fő domén különíthető el. Az aminoterminális végén helyezkedik el a hidrofób transzmembrán régió, melyet egy rövid linker régió követ. A karboxiterminális végén található a hidrofíl katalitikus aktivitásért felelős régió. Az enzim katalitikus doménje az eukariótákban konzervált. Ezzel szemben a fehérje N-terminális része nagyfokú variabilitást mutat. Növények esetében a fehérje 2, míg gombák esetében 7-8 transzmembrán régiót hordoz, mely

tartalmazza a szterol érzékelő domént (SSD) is. Az SSD részt vesz az enzim poszttranszlációs szabályozásában. Ezzel szemben a II-es osztályba tartozó enzim csak katalitikus doménnel rendelkezik és szolubilis formában van jelen a citoplazmában. Mindkét osztály esetében az enzim katalitikus régiójában megtalálható a HMG-KoA kötő és a kofaktor (NADPH/NADH) kötő hely. A katalízisben fontos négy aminosav (glutaminsav, aszparaginsav, lizin, hisztidin) pozíciója és orientációja, valamint az enzimek homodimér képzése a kétféle enzimtípusnál megegyezik. A reduktáz inhibitoraiként szolgáló sztatinok megkötésének módja egyforma az I-es és a II-es osztályban, viszont a velük szembeni érzékenység tekintetében eltérések figyelhetők meg, ugyanis az I-es osztály esetében a gátlás mértéke nagyobbak bizonyult (Liscum és mtsai., 1985; Friesen és Rodwell, 2004; Lombard és Moreia, 2011).

A HMG-KoA reduktáz gének szekvenciáját és a fehérjék szerkezetét már számos eukarióta szervezetben vizsgálták, pl. kínai aranyhőrcsög (Chin és mtsai., 1984), *Drosophila melaongaster* (Gertler és mtsai., 1988), *Arabidopsis thaliana* (Caelles és mtsai., 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (Basson és mtsai., 1988), *Phycomyces blakesleeanus* (Ruiz-Albert és mtsai., 2002) és *Rhizomucor miehei* (Lukács és mtsai., 2008) esetében.

A HMG-KoA reduktázt kódoló gének az egyes élőlényekben eltérő számban fordulnak elő. Az emlősökben általában egy reduktáz gén található, míg növényekben fajtól függően eltérő számban fordulnak elő. Egy gén található a *Schizosaccharomyces pombe* (Lum és mtsai., 1996), *Fusarium graminearum* és a *Neurospora crassa* genomjában (Seong és mtsai., 2006), míg a *Saccharomyces cerevisiae*-ben két gént (Basson és Thorsness, 1986) azonosítottak. A járomspórás gombák genomja egy vagy több HMG-KoA reduktáz gént kódol (Lukács és mtsai., 2009; Ruiz-Albert és mtsai., 2002). Az *Absidia glauca* (Burmester és Czempinski., 1994), *P. blakesleeanus* (Ruiz Albert és mtsai., 2002), *Rhizomucor miehei* (Lukács és mtsai., 2009) egy, a *Mucor mucedo* és *Parasitella parasitica* (Burmester és Czempinski, 1994) két, míg a *Mucor circinelloides* genomja három *hmgR* gént (Lukács és mtsai., 2009) hordoz.

2.3. A HMG-KoA reduktáz lokalizációja

A HMG-KoA reduktázok sejten belüli lokalizációja eltérő az egyes élőlénycsoportok esetében. Általánosságban elmondható, hogy az enzim az endoplazmatikus retikulum membránjában helyezkedik el, de számos példát találunk ettől eltérő lokalizációra is. Az emlősökben a reduktáz egy 97 kDa nagyságú fehérje és a hét transzmembrán régió segítségével az endoplazmatikus retikulum membránjához horgonyzódik ki. (Liscum és mtsai., 1985). Breitling és mtsai. (2002) kimutatták, hogy emlősökben létezik egy második izoformája is az enzimnek, amely az előzőtől függetlenül kódolt és a peroxiszómák

mátrixában fordul elő. A peroxisomális HMGCR a normál enzimaktivitás 5%-át teszi, mérete kisebb, mindössze 90 kDa, és szabályozásában is eltér az ER-ben előforduló enzimétől (Aboushadi és mtsai., 1999).

A. thaliana-ban a HMG- KoA reduktázoknak két gén által kódolt három izoformája ismert. A három izoforma egyenként 75 kDa nagyságú és csak egy vagy két transzmembrán régiót hordoznak, mely segíti az enzim szállítását az endoplazmatikus retikulumon kívüli más sejtszervecskébe, mint például a mitokondriumba vagy a kloroplasztisba (Learned és mtsai., 1989). Két elmélet született az izoprenoid bioszintézis megoszlását illetően a növényekben. Első esetben feltételezik, hogy mindhárom kompartmentben külön zajlik a teljes izoprén szintézis út, míg az alternatív elképzelés szerint, az izopentenil pirofoszfátot megelőző lépések a citoplazmában játszódnak le, majd a keletkező izopentenil-pirofoszfát egységek szállítódnak a különböző organellekbe, ahol a különböző, specifikus terpének szintetizálódnak (Sterner és mtsai., 1994).

A gombák esetében is találhatunk eltéréseket az izoenzimok számában és azok lokalizációjában. A *Hortaea werneckii* sótűrő, extrémofil gomba esetében megkülönböztethető egy mitokondriális (HwHmg1) és egy az endoplazmatikus retikulumban található (HwHmg2) enzim, melyek a környezet sókoncentrációjának függvényében eltérő arányban fordulnak elő (Vaupotic és mtsai., 2007). Régóta kutatott a *S. cerevisiae* élesztőben található két HMG-KoA reduktáz (Basson és mtsai., 1986). Mindkét izoenzim az ER membránjában lokalizálódik, viszont amíg a Hmg1 az endoplazmatikus retikulumnak közvetlenül a sejtmaggal érintkező részén található (*karmellae*), addig a Hmg2 az ER membrán sejtmagtól távoli részén fordul elő. Annak ellenére, hogy a két enzim katalitikus funkciója megegyezik, a szabályozásukban eltérés mutatkozik. A HmgR2 transzkripciós szintje anaerob körülmények között magasabb, viszont általánosságban elmondható, hogy a HmgR1 hosszabb féléletidővel rendelkezik (Koning és mtsai., 1996).

A járomspórás gombák közül a *Phycomyces blakesleeanus*-ban és a *Blakeslea trispora*-ban is kimutatták a különböző terpenoid vegyületek szintézisének kompartmentalizációját. Bejarano és mtsai. (1992) különböző tenyésztési körülmények (fény, dimetil-ftálsav, *car* gén mutációja) hatását vizsgálta a *P. blakesleeanus* karotin és ergoszterol termelésére. Az eredmények azt mutatják, hogy a két vegyület szintézisútja eltérő módon szabályozott. A radioaktívan jelölt mevalonsav prekursor különböző mértékben épült be a végtermékekbe, ami azt mutatja, hogy a különböző terpenoidok eltérő endogén és exogén forrásból jönnek létre. Annak ellenére, hogy *Phycomyces*-ben a HMG-KoA szintázt és a HMG-KoA reduktázt egy-egy gén kódolja, a terpénbioszintézis előanyagainak radioaktív jelölése után megállapították, hogy a karotin, ubikinon és a triacilglicerol különböző sejtszervecskében

képződnek. A szterolok és az ubikinon szintézise viszont feltehetőleg azonos sejtkompartmentumban valósul meg, de az is előfordulhat, hogy csak azonos intermediereket használ (Kuzina és mtsai., 2006).

2.4. A HMG-KoA reduktázok funkciója

Az ember esetében a HMGR katalizálja a koleszterin szintézis sebesség-meghatározó lépését (Friesen és Rodwell, 2004). Az utóbbi években számos kutatás irányul a koleszterinszint csökkentő gyógyszerek fejlesztésére. Ilyen anyagok a sztatinok, melyek a HMG-KoA reduktáz kompetitív gátlószerei.

A növények által szintetizált izoprenoidok fontos szerepet játszanak a növekedésben, fejlődésben, reprodukcióban, és a betegségekkel szembeni védekezésben. A növények sokféle izoprenoidot termelnek, amelyeknek egy része a citoplazmában keletkezik (szterolok, szeszkviterpének), emellett néhány osztályuk a plasztiszokban (karotinoidok, plasztokinon, fillokinon), a mitokondriumokban (ubikinon) vagy speciális vakuólumokban szintetizálódik. Sokféle HMGR izoformát azonosítottak, amelyeknek a sejten belüli eltérő kompartmentalizációja hozzájárul a változatos és specifikus izoprenoidok keletkezéséhez (Leivar és mtsai., 2005). A növényekben a citoszolikus HMG-KoA reduktáz olyan terpén vegyületek szintézisében játszik szerepet, amelyek részt vesznek a növény fejlődésében (ubikinon, abszizinsav, gibberellin, citokinin, brassinoszteroidok) a védekezésében (szeszkviterpének, digitonin, szteroid glikoalkaloidok, fitoalexinek). A plasztiszokban jelen levő enzimek közreműködnek a fotoszintézis folyamatában (klorofill, plasztokinon), a termés érésében (karotinoidok) és a környezet különböző ingereire adott válaszreakciókban. A HMGR aktivitása erősebb az osztódó sejtekben, mint az apikális merisztémában, és csökkent működést mutat a gyökércsúcsban és a felnőtt szövetekben (Sterner és mtsai., 1994; Friesen és Rodwell, 2004).

Az izoprenoid szintézis út enzimatiszus lépései állatokban és gombákban meglehetősen konzerváltak. Emellett a gombák membránjának fő szterol komponense, a specifikus izoprenoid út végtermékeként keletkező, az emlős koleszterinhez hasonló, ergoszterin. A *S. cerevisiae* Hmg1 és Hmg2 és az emlős HMG-KoA reduktázok azonos funkciója és nagyon hasonló szerkezete alkalmassá teszi az élesztőt koleszterinszint csökkentő gyógyszerek tesztelésére (Basson és mtsai., 1988). A *S. cerevisiae* enzimeit a spórák csírázása mellett nélkülözhetetlenek a vegetatív sejtek növekedésében is. A kísérletek azt bizonyítják, hogy a gének külön-külön végzett delécioja a sejtek életben maradását nem befolyásolja, ugyanis egymás funkcióját képesek kiegészíteni (Basson és mtsai., 1986). Koning és mtsai. (1996) által *S. cerevisiae* élesztőn végzett vizsgálatokból kiderül, hogy a Hmg1 és Hmg2 izoenzim az

endoplazmatikus retikulum eltérő részein lokalizálódnak, ennek következtében az ER különböző doménjének membrán proliferációját váltják ki. A Hmg1p szintjének emelésére az élesztősejt az ER sejtmag körüli membránjának növelésével válaszol, amelyhez esszenciális a 6. és 7. transzmembrán domén között elhelyezkedő loop G. A Hmg2p szint növelésének hatására a periférián lokalizálódó sávok, örvök mennyisége emelkedik meg (Koning és mtsai., 1996).

Az extrém körülmények között élő organizmusok, a membránjuk fluiditásának, többek közt a szterol összetétel változtatásán keresztül megvalósuló módosítása által tudnak alkalmazkodni a környezetükhöz. A *H. werneckii* halofil élesztőgombával végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy az eltérő sejtszervecskékben lokalizálódó HwHMG1 és HwHMG2 különböző só koncentrációkhoz való alkalmazkodásban játszik szerepet. Az ER-ben lokalizálódó HwHMG2 aktivitása az optimálistól eltérő, annál alacsonyabb vagy magasabb só koncentráció esetén megemelkedett. Ezzel szemben a mitokondriumban levő HwHMG1 a körülményektől függetlenül azonos expressziós szintet mutatott. A környezet sótartalma az enzimek ubiquitináció általi degradatív szabályozását is befolyásolhatja (Vaupotic és Plemenitas, 2007). A mérsékelt halofil archea, *Haloferx volcanii* esetében is kimutatták, hogy a magas só koncentráció magas HMGR transzkripciós szintet eredményez, viszont egy összetett szabályozási folyamat következtében a karotinoid és lipid szint ekkor volt a legalacsonyabb (Bidle és mtsai., 2007).

A *Trichoderma harzianum* esetében Cardoza és mtsai. (2006) azt figyelték meg, hogy a gomba *hmgR* génjét csendesítve, az érzékenyebbé vált a lovasztatinra, kevesebb ergoszterolt termelésére volt képes, ugyanakkor a *R. solani*-val és a *F. oxysporum*-mal szembeni hatása is csökkent (Cardoza és mtsai., 2006).

A *Fusarium graminearum* *HMGR1* génjének mutációja következtében a gomba növekedése és fejlődése normál működést mutatott, viszont a mikotoxin termelő képessége csökkent (Seong és mtsai., 2006).

A *Mucor racemosus* fonalas gombában a HMG-KoA reduktáz kompetitív gátlószerei, a sztatinok apoptotikus folyamatokat indukálnak. Ezen dimorf fonalas gomba normális fejlődéséhez elengedhetetlenek a Ras fehérjék. Ha az enzim gátlása által a fehérjék prenilációja zavart szenved, az súlyos következményekkel jár. Megakadályozva a sporangiospóra csírázását, alacsony növekedési rátát idéz elő, amely alacsonyabb életképességhez vezet. Megnövekedik a sejtsűrűség, citoplazma kondenzáció, vakuólum felhalmozódás figyelhető meg, ugyanakkor a DNS fragmentáció következtében nukleoszóma multimerek keletkeznek. Lovasztatin hatására élesztőszerű sejtek keletkeztek, a hifa növekedés is leáll (Roze és Linz, 1998).

2.5. A *Mucor circinelloides*-ben található HMG-KoA reduktázok jellemzése

Laborunkban korábban izolálták a *M. circinelloides* három *hmgR* génjét és funkcionális vizsgálataikat megkezdték. A génekről átíródott fehérjék főbb jellemzőit az 1. Táblázat foglalja össze. Mindhárom feltételezett fehérjében azonosították a HMG-kötő és a NAD(P)H kötő motívumokat. A HmgR1 esetében 6, a HmgR2 esetében 8, míg a HmgR3 esetében 5 transzmembrán régiót azonosítottak. Mindhárom feltételezett fehérjében azonosították az SSD domént is, mely a HmgR2 esetében 11 aminosavval rövidebb a másik két fehérjéhez képest. Ez az eltérés közreműködhet abban, hogy a fehérjék poszttranszlációs szabályozása és szterin érzékelése eltérő lehet.

1. Táblázat: A *M. circinellodes* HmgR1, HmgR2 és HmgR3 fehérjéinek jellemzői (Nagy és mtsai., 2014)

	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)

Az eddigi vizsgálatok alapján, mindhárom gén kifejeződik, de a gének átíródása eltérő szabályozás alatt áll, ami funkcióbeli különbségeket jelez (Nagy és mtsai., 2014). A *M. circinelloides* HMG-KoA reduktázainak kifejeződését a környezet oxigéntenzíója eltérő módon szabályozza és mindegyik érzékeny az ozmotikus viszonyok megváltozására is. Úgy tűnik, fontos szerepet töltenek be a változó környezeti feltételekhez történő alkalmazkodásban. A *hmgR1* gén transzkriptuma csak a micéliumban volt detektálható és átíródását a hőmérséklet és a környezet oxigén tartalma jelentősen meghatározta (anaerob

körülmények közt a gén transzkripciója nem volt kimutatható). A *hmgR2* és a *hmgR3* gének transzkriptumai már a csírázó spórákban jelen vannak, működésüket pedig ugyancsak szabályozza a közeg oxigén szintje (a *hmgR2* kifejeződése anaerob körülmények közt csökken, míg a *hmgR3*-é, ezzel ellentétesen, megnő). Az utóbbi két gén túlműködtetése jelentősen emelte a gomba karotinoid tartalmát és csökkentette a sztatinokkal szembeni érzékenységét.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Laborunkban a *M. circinelloides* MS12 törzsének genomjában kódolt három HMG-KoA reduktáz gént (*hmgR1*, *hmgR2*, *hmgR3*) sikeresen izolálták és funkcionális elemzésüket megkezdték. A gének különböző körülmények között mutatott relatív transzkripciós szintje alapján elmondható, hogy az egyes gének szerepe eltérő lehet a környezethez való alkalmazkodás során, illetve szabályozásukban is különbségek mutatkozhatnak. Az eddigi eredmények alapján a fő célkitűzésünk az egyes génekről átíródó fehérjék intracelluláris lokalizációjának meghatározása, amely hozzásegít a sejtben lejátszódó folyamatokban, valamint a különböző specifikus izoprenoidok bioszintézisében betöltött, esetlegesen eltérő szerepük tisztázásához.

Mindezek alapján a következő konkrét célokat tűztük ki:

1. A HmgR1, HmgR2, HmgR3 fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára alkalmas gombatörzsek létrehozása

Célul tűztük ki a *M. circinelloides*-ben található három HMG-KoA reduktáz (HmgR1, HmgR2, HmgR3) zöld fluoreszcens proteinnel (GFP) való fúziójának megvalósítását. Ennek érdekében a következő kísérleteket terveztük:

- (i) olyan vektorkonstrukciók készítése, amelyekben az egyes *hmgR* gének hidrofób, transzmembrán doméneket kódoló régiója a *gfp* génnel van összeépítve,
- (ii) az elkészült plazmidok arra alkalmas *M. circinelloides*-be történő transzformálása,
- (iii) a sikeres transzformáció után nyert izolátumok vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal.

2. A HmgR fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával

További célunk volt, a HmgR-GFP fúziós fehérjéket kifejező transzformánsok elemzése konfokális mikroszkópiával, melynek során különböző organellekre specifikus festékek alkalmazásával terveztük vizsgálni a fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációját.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A kísérletek során felhasznált törzsek

A transzformációs kísérletekhez és a HMG-KoA reduktázok sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához a *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* (CBS 277.49 izolátum) *leuA* és *pyrG* auxotróf mutáns MS12 törzsét használtuk.

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

4.2. A kísérletek során használt tápoldatok és táptalajok

YNB tápoldat/táptalaj: 1% glükóz
 0,15% (NH₄)₂SO₄
 0,15% Na-L-glutaminát
 0,05% Yeast Nitrogen Base

Amennyiben a kísérlethez erre szükség volt, a táptalajt 0,05% uracillal és/vagy leucinnal egészítettük ki.

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

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

YEG tápoldat/táptalaj: 1% glükóz
 0, 5% élesztőkivonat

Amennyiben szilárd táptalajra volt szükség a fenti tápoldatokat 2% agarral egészítettük ki.

4.3. Tenyésztési körülmények

A *M. circinelloides* MS12 törzsét uracillal és leucinnal kiegészített YNB táplemezen tenyésztettük 25° C-on. A genetikai transzformációt követően a gombákat leucinnal kiegészített YNB táplemezen vagy tápoldatban növesztettük. A fluoreszcens és konfokális

mikroszkópos vizsgálathoz a törzseket 2 napon keresztül 3% glükózt tartalmazó leucinnal kiegészített YNB tápoldatban ráztuk.

A klónozáshoz használt *E. coli* törzset ampicillinnel kiegészített LB táplemezen vagy tápoldatban tenyésztettük, 37° C-on.

4.4. Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek

4.4.1. Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez felhasznált oldatok

100 mM CaCl₂ oldat.

70% glicerín

4.4.2. *E. coli* sejtek transzformációjához felhasznált oldatok

TCM puffer: 10 mM Tris (pH 7,5); 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂

Antibiotikum törzsoldat: 50 mg/ml ampicillin (Sigma) törzsoldat steril desztillált vízben oldva.

4.4.3. Gélelektroforézishez használt anyagok

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6), 1 mM Na₂EDTA

Agaróz gél: a fragmentum mérettől függően 0,8-2% agaróz TAE pufferben oldva

Etídium-bromid törzsoldat (Sigma): 10 mg/ml desztillált vízben oldva

Mintapuffer: 6x DNS mintapuffer (Fermentas)

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

4.4.4. Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok

Protoplasztáló oldat: 100 mM Nátrium-foszfát puffer, 0,8 M szorbit, 1,5% csigaenzim

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

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

PMC puffer: 40% PEG 4000, 10 mM MOPS, 0,6 M szorbit, 50 mM CaCl₂

4.4.5. Mitokondrium festéshez használt reagens

MitoTracker Red FM (Life Technologies) fluoreszcens festéket alkalmaztuk a gyártó utasításainak megfelelően.

4.4.6. Endoplazmás retikulum festéshez használt reagens

Er-Tracker Red (BODIPY TR Glibenclamide (Life Technologies) fluoreszcens festéket alkalmaztuk a gyártó utasításainak megfelelően.

4.5. Primerek

2. Táblázat. A *gfp* gén felszaporításához használt indítószekvenciák.

Primer	5'-3'	Termék	A termék mérete (bp)
GFP _{h1c1}	TTAGCTAGCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	<i>gfp</i> a <i>hmgR1</i> -	717 bp
GFP _{h1c2}	TTAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA	<i>gfp</i> fúziós génhez	
GFP _{h2c1}	CGCGAATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	<i>gfp</i> a <i>hmgR2</i> -	
GFP _{h2c2}	TTAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA	<i>gfp</i> fúziós génhez	
GFP _{h3c1}	GCGGAATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	<i>gfp</i> a <i>hmgR3</i> -	
GFP _{h3c2}	TTAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA	<i>gfp</i> fúziós génhez	

4.6. A kísérleti munka során előállított (pH1cGFP, pH2cGFP és pH3cGFP) vektorkonstrukciók építéséhez használt plazmidok

A kísérleteinkhez olyan transzformációs vektorokat hoztunk létre, melyeket a *M. circinelloides* MS12 leucin/uracil kettős auxotróf törzsbe juttattunk be. A *hmgR-gfp* fúziós gének kifejeztetéséhez minden konstrukcióban a *Mucor gpd1* (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, EMBL azonosító: AJ293012) gén promóter és terminális (*gpd1P* és *gpd1T*) régióját használtuk. A szabályozó régiókon kívül mindegyik vektor tartalmazta az orotidin-5-foszfát-dekarboxilázt kódoló és az MS12 törzs uracil auxotrófiáját komplementáló, *pyrG* gént (Benito és mtsai., 1992), melyet szelekciós markerként alkalmaztunk.

3. Táblázat. A dolgozatban felhasznált plazmidok és leírásuk

Plazmid	Leírás (zárójelben a szelekciós markerek)
pJET 1.2	Klónozó vektor (Amp)
pNG1	Expressziós kazetta; <i>Mucor gpdP</i> , <i>hmgR1</i> , <i>gpdT</i> (Amp és <i>pyrG</i>)
pNG2	Expressziós kazetta; <i>Mucor gpdP</i> , <i>hmgR2</i> , <i>gpdT</i> (Amp és <i>pyrG</i>)
pNG3	Expressziós kazetta; <i>Mucor gpdP</i> , <i>hmgR3</i> , <i>gpdT</i> (Amp és <i>pyrG</i>)
pPT43/gfp	Expressziós kazetta; <i>Mucor gpdP</i> és <i>gpdT</i> között <i>gfp</i> (Amp és <i>pyrG</i>)
pH1cGFP	A pNG1 plazmidban található <i>hmgR1</i> gén fúziója <i>gfp</i> -vel (Amp és <i>pyrG</i>)
pH2cGFP	A pNG2 plazmidban található <i>hmgR2</i> gén fúziója <i>gfp</i> -vel (Amp és <i>pyrG</i>)
pH3cGFP	A pNG3 plazmidban található <i>hmgR3</i> gén fúziója <i>gfp</i> -vel (Amp és <i>pyrG</i>)

A vektorok építéséhez a korábbi munkák során létrehozott pPT43/*gfp*, pNG1, pNG2, pNG3 (Nagy és mtsai., 2014) és pPT81 vektorokat használtuk. A pPT43/*gfp* hordozza a *Mucor gpdT* és *gpdP* szabályozó régió közé épített *gfp* gént, illetve a pNG1, pNG2 és pNG3 a *Mucor hmgR1*, *hmgR2* illetve *hmgR3* géneket a *gpdP* és *gpdT* szabályozó régiók között. A munka során felhasznált plazmidokat a 3. Táblázat tartalmazza.

4.7. Vizsgálati módszerek

4.7.1. Genomi DNS kivonása *M. circinelloides*-ből

A genomi DNS kivonást MasterPure Yeast DNA purification kittel (Epicentre) végeztük a gyártó utasításait követve.

4.7.2. RNS tisztítása *M. circinelloides*-ből

Az RNS tisztításához E.Z.N.A Total RNA Kit II-t (OmegaBiotek) használtunk a gyártó utasításait követve.

4.7.3. DNS gélelektroforézis

A nukleinsav mintákhoz mintapuffert adtunk, majd a várt fragmentumok és a gél méretétől, illetve a kísérlettől függően 0,8–2% agaróz gélben, 80-110 V feszültséggel, 1-4 órán keresztül végeztük az elválasztást. Mind az agaróz gél készítéséhez, mind futtató puffernek TAE puffert használtunk. A nukleinsavakat etidíum-bromidos festéssel (0,5 µg/ml), UV fény alatt detektáltuk. A fragmentum méretének meghatározásához különböző molekulásúly markereket használtunk.

4.7.4. DNS visszaizolálása agaróz gélből

A visszaizolálni kívánt DNS fragmentumokat tartalmazó gélrészletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki. A DNS-t a DNA Extraction Kit (Fermentas) vagy a Zymoclean™ Large fragment DNA Recovery Kit (ZymoResearch) segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

4.7.5. A *gfp* gén amplifikálásához használt reakciókörülmények

A *gfp* gén amplifikálásához a laborunkban korábban létrehozott pPT43/*gfp* vektort használtuk. A vektor *gpdP* és *gpdT* szabályozó régiók között tartalmazza a *gfp* gént. Az amplifikáláshoz Phusion High-Fidelity DNA Polymerase-t használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A reakciót 25 µl végtérfigatban mértük össze a következők szerint:

20-50 ng plazmid DNS
 0,5-0,5 μ M specifikus primer
 200 μ M dNTP mix
 1x Phusion HF puffer (1,5 mM $MgCl_2$ -vel kiegészítve)
 1 U Phusion DNA Polymerase

Az amplifikálás körülményei:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
95 °C	0,5 perc	30 ciklus	denaturálás
60 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	0,5 perc		láncszintézis
72 °C	7 perc	1 ciklus	végző láncszintézis

4.7.6. Restriktions emésztések, ligálás, plazmidok építése és plazmid DNS tisztítása

A restriktions emésztéseket, ligálásokat a standard módszerek szerint végeztük (Sambrook és mtsai., 1989). A DNS fragmentumokat az InsT/AclonePCR Product Cloning Kit-ben (Thermo Scientific) található pTZ57R/T klónozó vektorba vagy a CloneJet TM PCR cloning Kit-ben található pJET2.1 (Thermo Scientific) klónozó vektorba építettük a gyártó utasításait követve.

Plazmid DNS tisztításához a Viogene Mini-M Plasmid DNA Extraction System (Viogene), nagyobb mennyiségű plazmid DNS tisztításához a Viogene Midi-V100 Plasmid DNA Extraction System (Viogene) kitéket használtuk a gyártó utasításai szerint.

4.7.7. Kompetens *E.coli* sejtek készítése

E.coli TOP10F⁻ 16 órán át nevelt tenyészet 1ml-ét 30 ml LB tápoldatba átváltva, a baktériumokat OD₆₆₀=0,5 érték eléréséig 37°C-on 200 rpm rázatás mellett növesztettük. A tenyészetet centrifugáltuk (3000rpm/10perc,4°C), majd a sejteket, az átváltott tenyészettel 1-1 arányban, hideg 100 mM-os $CaCl_2$ oldatban felfuszpendáltuk. Centrifugálást (3000 rpm/10 perc, 4 °C) követően a lépést megismételtük, majd 1 órán át tartó jeges vízfürdőben történő inkubációt követően ismét centrifugáltuk a sejteket (3000 rpm/10 perc, 4°C). A kiülepedett sejteket 1/20 térfogatú hideg, 20% glicerinnel tartalmú 100 mM $CaCl_2$ oldatban felfuszpendáltuk. A kompetens sejteket 100 μ l mennyiségekbe szétadagoltuk, ezeket a későbbi felhasználásig -70 °C-on tároltuk (így hónapokig eltarthatók).

4.7.8. Baktérium transzformáció

100 µl fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 15-25 µl ligátumot, és 100 µl TCM puffert adtunk hozzá és a baktériumokat 30 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 1 perc 30 másodpercre 42 °C-ra helyeztük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A baktériumokat végül ampicillin tartalmú (100 µg/ml) LB táptalajra szélesztettük. A Petri-csészéket 16 órán keresztül 37°C –on inkubáltuk.

4.7.9. Protoplasztképzés

A *M. circinelloides* protoplasztok képzéséhez a sejtek előkészítését celofánon történő előneveléssel végeztük el. Az MS12 törzs MEA táptalajon, 4-5 napon keresztül, fényben nevelt tenyészetéről steril desztilláltvízzel lemostuk a sporangiospórákat, majd a tömény spórasuszpenzióból oltótűvel friss, celofánkoronggal fedett YEG táptalajra oltottunk. A tenyészeteket 25 °C-on, 16 órán keresztül neveltük. 16 óra elteltével a micéliumkorongokat protoplasztáló oldatba helyeztük, majd 3 órán át szobahőmérsékleten 50 rpm rázatással elősegítettük a képződő protoplasztok leválását. A sejtfaloldásához saját készítésű, éticsiga (*Helix pomatia*) gyomorból preparált lítikus enzimkeveréket használtunk. SMC pufferrel alaposan átmosva a micéliumkorongokat a protoplasztokat tölcserbe helyezett gézen keresztül sterilen átszűrtük, így megszabadultunk a micéliumtörmelétől. A centrifugálással (3000 rpm, 10 perc, 4 °C) összegyűjtött protoplasztokat 5 ml SMC pufferrel mostuk, majd újbóli centrifugálás után 250 µl SMC pufferbe vettük fel.

4.7.10. A protoplasztok transzformációja

Az általunk alkalmazott módszer a van Heeswijck és Roncero (1984) által leírt PEG-mediált transzformáció módosítása. A 250 µl SMC pufferbe felvett protoplasztokhoz 5-10 µg plazmidot és 20 µl PMC puffert adtunk. Ezután a mintákat fél órán keresztül jégen inkubáltuk. További 2,5 ml PMC puffer hozzáadása után a mintákat 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd azokat 20 ml SMC pufferrel hígítva centrifugáltuk. A protoplasztok regenerációjának elősegítéséhez a kiüledett sejtekhez szorbitot tartalmazó YPG tápoldatot adtunk, majd fél órán át 25 °C-on inkubáltuk őket. Centrifugálás után SMC pufferrel mostuk a sejteket, majd a kiülepített sejteket kis mennyiségű (100-200 µl) SMC-ben szuszpendáltuk és szorbittal kiegészített YNB fedőagarral összekeverve szorbitot tartalmazó YNB csészékre öntöttük. A dolgozatban szereplő vektorkonstrukciók csak *pyrG* gént hordoznak szelekciós markerként, ezért a táptalajokat leucinnal egészítettük ki. A csészéket 4-10 napig, a transzformáns telepek megjelenéséig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

4.7.11. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok

A vizsgálatokhoz Zeiss Axiolab típusú mikroszkópot használtuk. A GFP jel nyomon követéséhez filter 09-et használtunk, melynek excitációs értéke 450-490 nm, míg az emissziós értéke 515 nm.

4.7.12. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

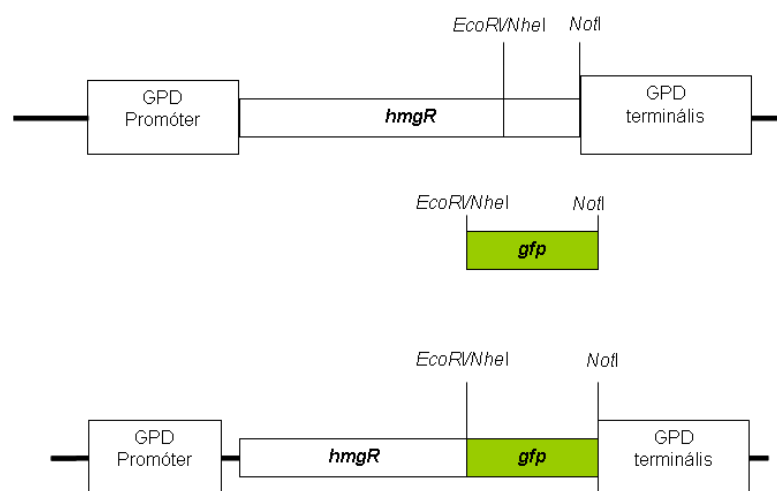
A konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatokat az SZBK Mikroszkópos sejtanalizáló laborban végeztük Olympus Fluoview FW1000 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével. GFP esetében az excitáció 488 nm, míg az emisszió 510 nm volt. Az Er-Tracker Red és MitoTracker Red esetében az excitáció értéke 543 nm, az emisszió értéke 619 nm volt.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

5.1. A fúziós fehérjék létrehozásához szükséges vektorkonstrukciók megépítése

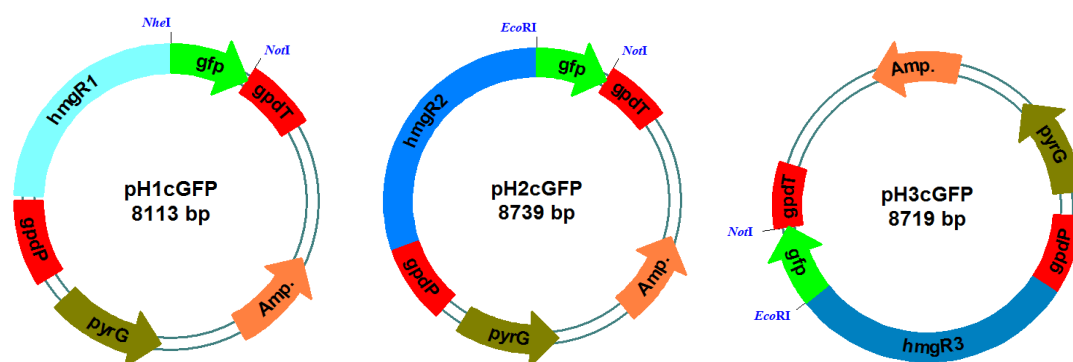
A fúziós proteinek összeépítéséhez rendelkezésünkre álltak a laborunkban már előzőleg létrehozott, az egyes *hmgR* gének túlműködtetéséhez használt, expressziós vektorok (pNG1, pNG2, pNG3) (Nagy és mtsai., 2014). A *gfp* gént szintén a laborban korábban létrehozott pPT43/*gfp* vektorból nyertük.

A *hmgR* géneket tartalmazó pNG1-3 vektorokat restriktációs enzimekkel emésztettük. Az emésztéseket a *hmgR1* gént hordozó pNG1 esetben *NheI*-*NotI*, míg a *hmgR2* és *hmgR3* gént hordozó pNG2 és pNG3 esetében *EcoRI*-*NotI* enzimekkel végeztük. Ezáltal a plazmidokat felnyitottuk és egyúttal csonkoltuk a gének azon szakaszát, mely az enzimek katalitikus aktivitásért felelős régióját kódolja. A pPT43/*gfp* vektorból a *gfp* gént a megfelelő hasítóhelyet tartalmazó indítószekvenciákkal felszaporítottuk, majd a megfelelő restriktációs emésztést követően az emésztett pNG1-3 plazmidokkal összeligáltuk. A plazmidok létrehozásának folyamata az **1. ábrán** látható.



1. ábra A vektor építés folyamata.

Az így létrehozott pH1cGFP, pH2cGFP és pH3cGFP plazmidokat a **2. ábra** mutatja be. A vektorok az egyes enzimek transzmembrán régióit kódoló génszakaszokat hordozzák a *gfp* génnel összeépítve. A vektorok gombába juttatása után a fúziós gén kifejeződik és az a transzmembrán szakaszok segítségével a sejten belül a megfelelő membránba tud beépülni, mely a GFP fehérje segítségével nyomon követhető.

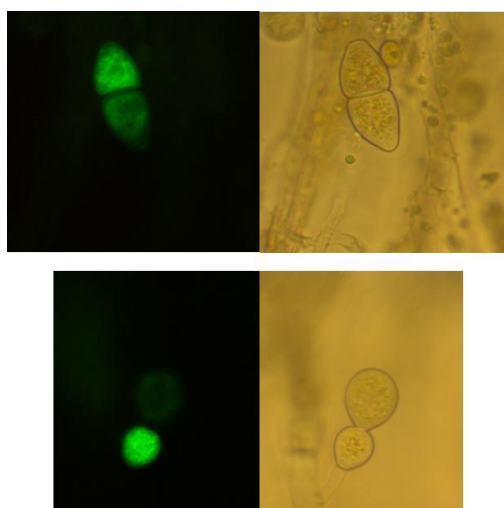


2. ábra. A lokalizáció vizsgálatához épített vektorkonstrukciók.

A létrehozott vektorokkal sikeres PEG-mediált protoplaszt transzformációt hajtottunk végre. A transzformálást követően az izolátumok közül plazmidonként kiválasztottunk 1-1 transzformáns telepet (MS12-pH1cGFP, MS12-pH2cGFP és MS12-pH3cGFP). DNS és RNS kivonást követően igazoltuk a *gfp* jelenlétét a transzformánsokban és megkezdjük azok jellemzését.

5.2. A transzformánsok vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával

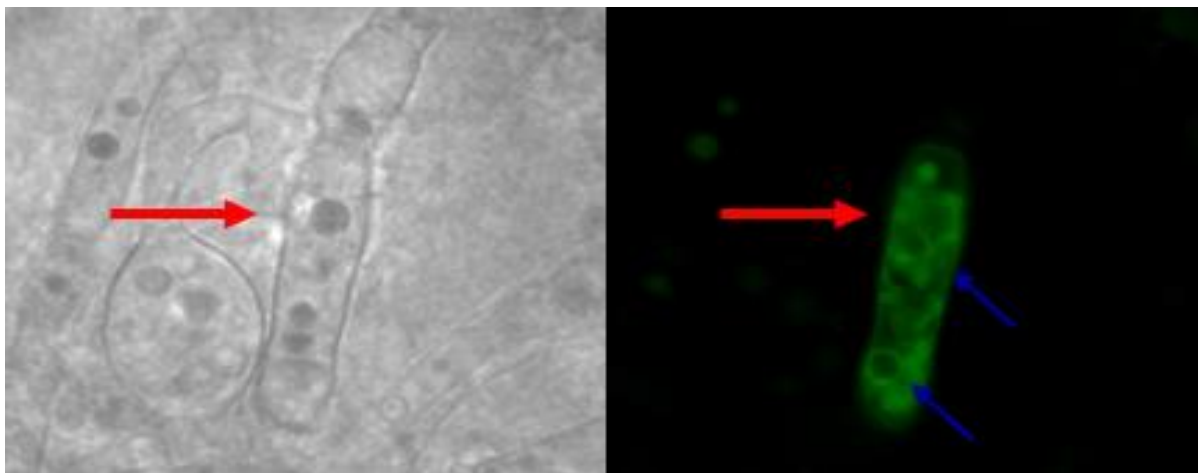
A transzformánsok ellenőrzését fluoreszcens mikroszkópiával végeztük, azonban a zöldfluoreszcens jel elég gyengének tűnt, ami a bejuttatott plazmidok esteleges alacsony kópiaszámával is magyarázható. Ezért a transzformánsokból szelektív körülmények közt monosporangialis telepeket képeztünk és azokat többször passzáltuk. A legerősebb GFP



3. ábra Az MS12-pH1cGFP izolátum fény és fluoreszcens mikroszkóppal készített felvétele.

jelintenzitásokat az MS12-pH2cGFP és MS12-pH3cGFP vektorokat tartalmazó transzformánsok esetében a leoltástól számított 48. órában 3% glükózt tartalmazó YNB tápoldatos rázatás után detektáltuk. Minden további vizsgálathoz ezt a tenyésztési körülményt

alkalmaztuk. Az MS12-pH1cGFP izolátum esetén szintén láttunk GFP pozitív sejteket, azonban e sejtek aránya nagyon alacsonynak bizonyult a további vizsgálatokhoz (**3. ábra**). Konfokális mikroszkóppal megvizsgálva az izolátumokat azt tapasztaltuk, hogy a sejten belül a GFP egy nagy kiterjedésű organellumban van jelen (**4. ábra**), azonban a további vizsgálatok érdekében keressük azt a tenyésztési körülményt, mellyel sikeresen vizsgálhatóvá válnak ezek az izolátumok is.

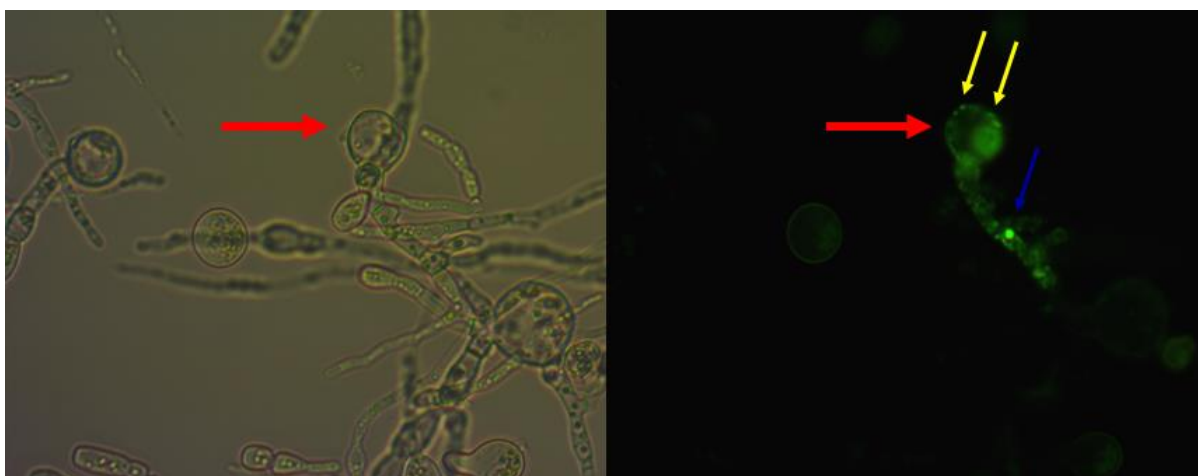


4. ábra Az MS12-pH1cGFP izolátum konfokális mikroszkóppal készített felvétele.

Piros nyíl jelöli a GFP pozitív sejtet, míg kék nyíl jelöli a sejten belüli GFP jelet.

A monosporangiális telepek izolálását követően mind a pH2cGFP, mind a pH3cGFP vektort hordozó transzformánsokban megnőtt azon sejtek száma, melyek pozitív GFP jelet mutattak.

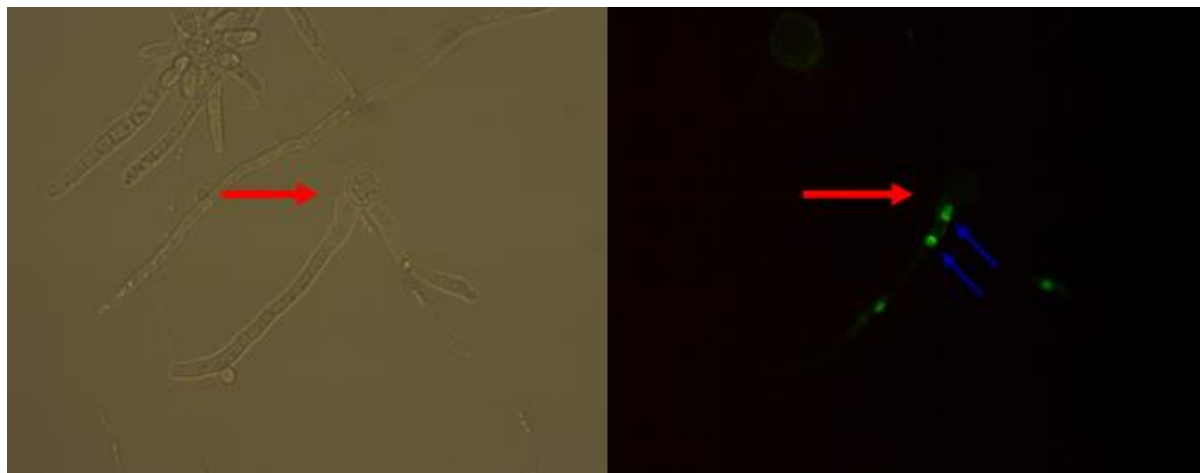
A **5. ábrán** az MS12-pH2cGFP izolátum fénymikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos felvétele látható. A piros nyíl mutatja a GFP-t kifejező sejtet. A sejten belül két különböző méretű organellumra utaló GFP jelet láthatunk. Kék nyíllal jelöltük a nagyobb méretű, míg sárga nyíllal jelöltük a kisebb méretű GFP jeleket.



5. ábra Az MS12-pH2cGFP izolátum fény és fluoreszcens mikroszkópos felvétele.

Piros nyíl jelöli a GFP pozitív sejtet. Kék nyíl jelöli a nagy méretű GFP jelet, míg a sárga nyíl jelöli a kisebb méretű GFP jelet a sejten belül.

Az MS12-pH3cGFP transzformáns esetében a sejten belül a GFP mintázata nem mutatott különbségeket. A **6. ábrán** látható, hogy a sejten belül a GFP nagyméretű jelet ad és a HmgR2-GFP fúziós fehérjével ellentétben nem található kisebb méretű GFP jel.



6. ábra Az MS12-pH3cGFP izolátum fény és fluoreszcens mikroszkópos felvétele.

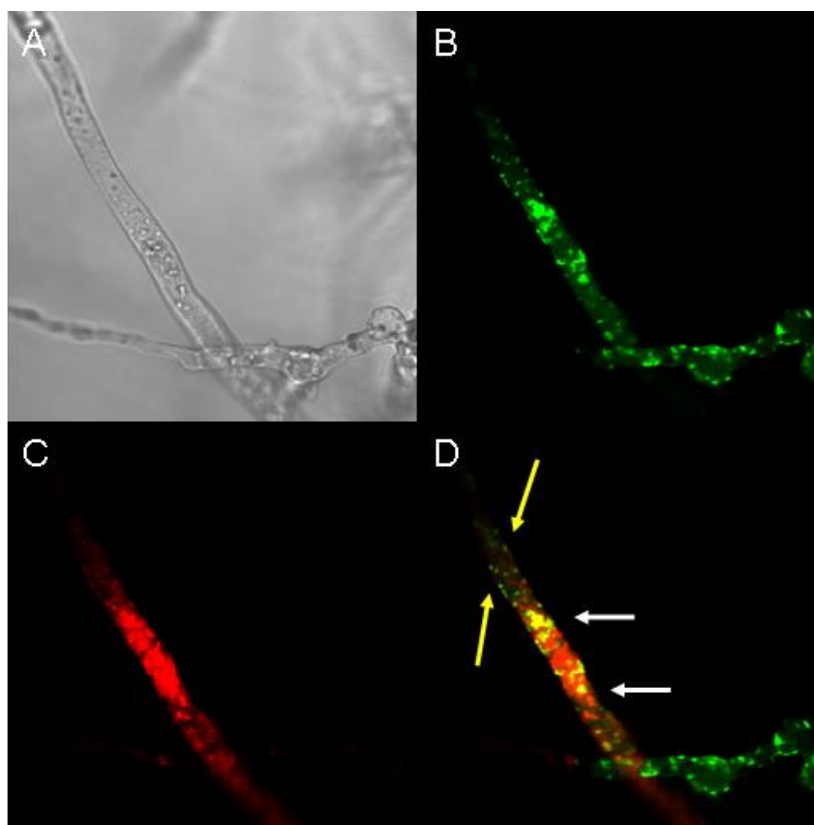
Piros nyíl jelöli a GFP pozitív sejtet. Kék nyíl jelöli a nagy méretű GFP jelet.

A fluoreszcens mikroszkópos felvételek és a GFP jel alapján úgy tűnik, hogy a nagyobb méretű és kiterjedésű GFP jelet mutató organellem valószínűleg az endoplazmatikus retikulum, ugyanis a HMG-KoA reduktázok főként az endoplazmatikus retikulum membránjában lokalizálódnak (Liscum és mtsai., 1985; Basson és mtsai., 1986; Learned és mtsai., 1989; Friesen és Rodwell, 2004; Lombard és Moreia, 2011). Ennek megállapításához endoplazmatikus retikulum festést végeztünk Er-Tracker Red fluoreszcens festék felhasználásával. Ez a festék rendkívül érzékeny, mivel a benne található glibenklamid az ER specifikus ATP-szenzitív kálium-csatornák szulfonurea receptoraihoz képes kapcsolódni.

A pH2cGFP-t hordozó transzformánsok esetében a sejten belül pontszerű GFP jeleket is láthattunk és mivel gombák esetében az endoplazmatikus retikulumon kívül a HMG-KoA reduktázok a mitokondriumban is előfordulhatnak (Vaupotic és mtsai., 2007), ezért célszerűnek gondoltuk a mitokondriumok festésének elvégzését is. A festéshez MitoTracker Red FM fluoreszcens festéket használtunk, mely képes a sejthártyán passzívan átjutni a membránpotenciáltól függően. A sejtben lejátszódó oxidációs folyamatok során, a festékben található tiol-reaktív molekulacsoportnak köszönhetően az eredetileg fluoreszcens tulajdonsággal nem rendelkező festék fluoreszcenssé válik.

5.3. Kolokalizációs vizsgálatok az endoplazmatikus retikulummal és mitokondriummal

Az endoplazmatikus retikulum és mitokondrium festését követően a mintákat konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A GFP kék (475 nm) és UV (396 nm) fénnel egyaránt gerjeszthető és zöld (508 nm) fényt bocsájt ki, míg az ER Tracker 587 nm-es fénnel gerjeszthető és 615 nm-es piros fényt bocsájt ki. A MitoTracker Red 581 nm-es fénnel gerjeszthető és 644 nm-es mélypiros fényt bocsájt ki. A kibocsájtott fények jól elkülöníthetők a konfokális mikroszkóp szűrőinek segítségével, így vizsgálható a kolokalizáció.



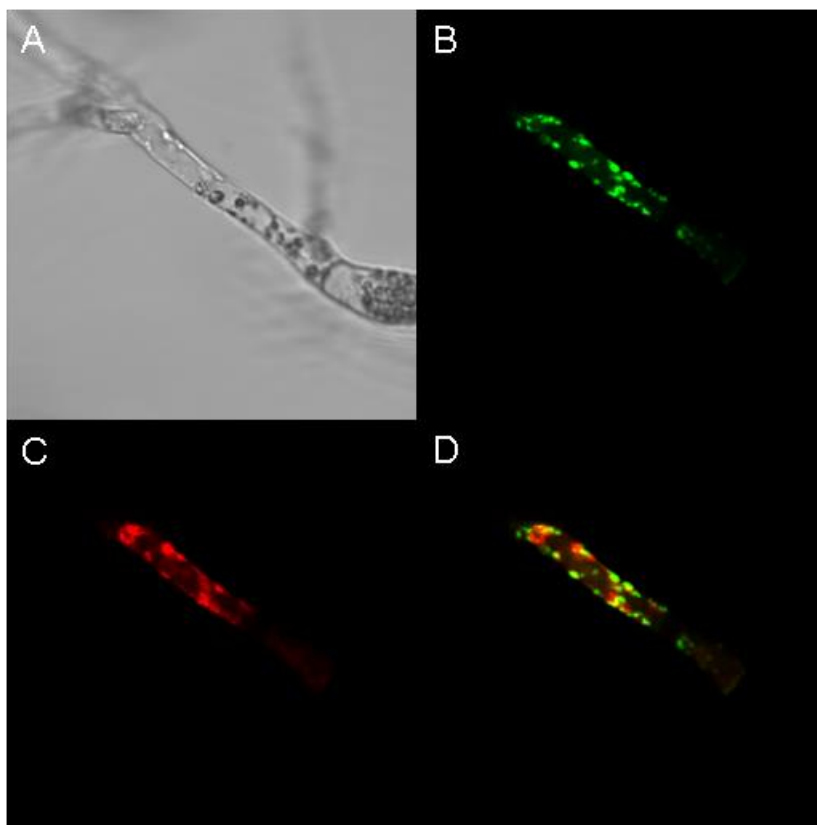
7. ábra Az MS12-pH2cGFP transzformáns konfokális mikroszkóppal készített felvételei.

A: konfokális mikroszkópos kép, B: GFP, C: Er-Tracker Red festés, D: a GFP és az Er-Tracker Red festéssel készült kép egymásra helyezve.

Fehér nyíl jelöli a kolokalizációt és sárga nyíl jelöli a kis méretű GFP jeleket, melyek nem mutatnak kolokalizációt az ER-rel.

Az MS12-pH2cGFP transzformáns Er-Tracker Reddel történő festését követően a **7. ábrán** látható, hogy a sejten belül a GFP (**7. ábra**, B kép) két különböző méretű formában ad jelet. A C képen az endoplazmatikus retikulum látható melyet, ha rávetítünk a GFP-s képre (**7. ábra**, D kép), akkor sárga színnel láthatóvá válik (fehér nyilak) a kolokalizáció, mely azt mutatja, hogy a HmgR2 az endoplazmatikus retikulum membránjában lokalizálódik. Azonban az ábrán sárga nyíllal jelölve láthatunk kis pontszerű GFP jeleket is, melyek nem mutatnak kolokalizációt az endoplazmatikus retikulummal.

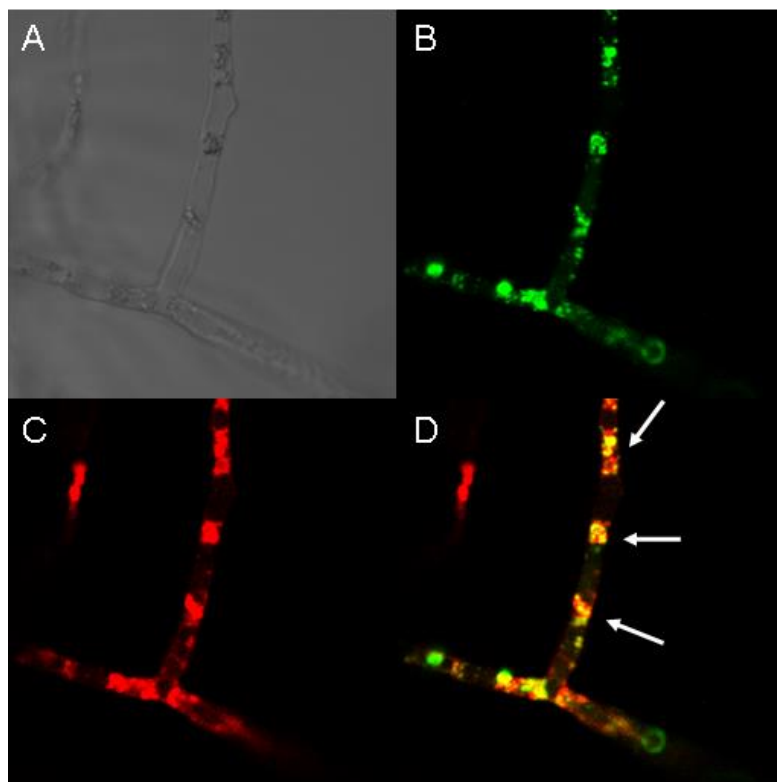
A **8. ábrán** ugyanennek az izolátumnak a MitoTracker Red festékkel festett preparátuma látható. A **8. ábra** C képen a megfestett mitokondriumok láthatóak. A mitokondriumok festését követően azonban azokkal nem mutatható ki kolokalizáció (**8. ábra**, D kép), vagyis a HmgR2 nem lokalizálódik a mitokondriumban, ezért a kis pontszerű GFP jelet adó kompartmentek azonosításához további vizsgálatok szükségesek.



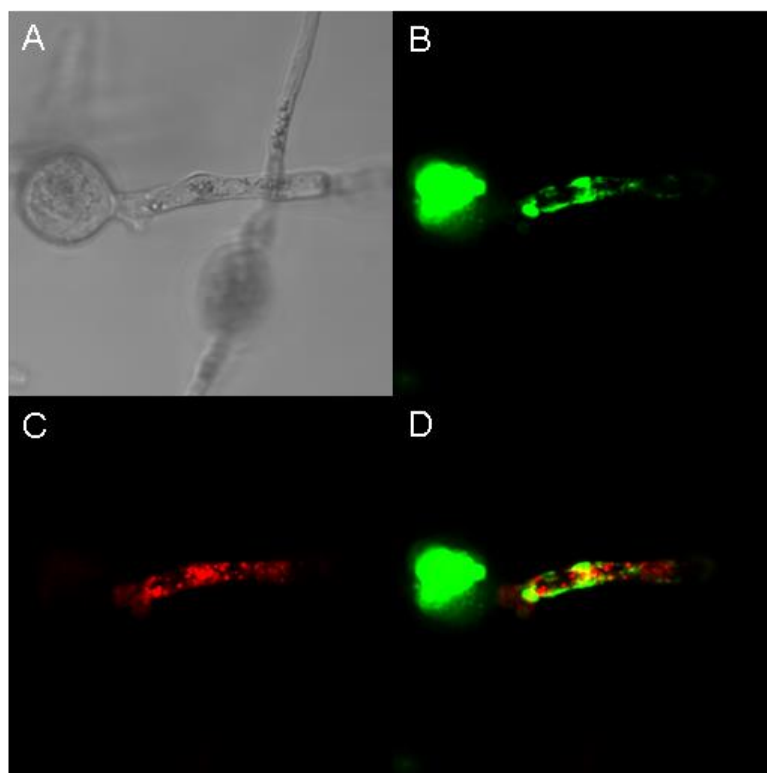
8. ábra Az MS12-pH2cGFP-4 transzformáns konfokális mikroszkóppal készített felvételei. A: konfokális mikroszkópos kép, B: GFP, C: MitoTracker Red festés, D: a GFP és az MitoTracker Red festéssel készült kép egymásra helyezve.

Az MS12-pH3cGFP vektort hordozó transzformánsok esetében az endoplazmatikus retikulum festését követően teljes átfedést tapasztaltunk a GFP és az Er-Tracker jele között (**9. ábra**), vagyis ki lehet jelenteni, hogy a HmgR3 a sejten belül az endoplazmatikus retikulumban lokalizálódik. A kolokalizációt az ábrán fehér nyíllal jelöltük.

Ezeknél az izolátumoknál is elvégeztük a mitokondriumok festését (**10. ábra**), azonban itt sem tapasztaltunk kolokalizációt a mitokondrium és a HmgR3 között. Az ábrán jól látható, ahogy a GFP jel körülöleli a megfestett mitokondriumokat.



9. ábra Az MS12-pH3cGFP izolátum konfokális mikroszkóppal készített felvétele.
A: konfokális mikroszkópos kép, **B:** GFP, **C:** ER-Tracker Red, **D:** a GFP és az Er-Tracker Red festéssel készült kép egymásra helyezve. A fehér nyilak jelzik a kolokalizációt.



10. ábra Az MS12-pH3cGFP izolátum konfokális mikroszkóppal készített felvétele.
A: konfokális mikroszkópos kép, **B:** GFP, **C:** Mito-Tracker Red,
D: a GFP és az MitoTracker Red festéssel készült kép egymásra helyezve.

Emlősökben a HMG-KoA reduktáz az endoplazmatikus retikulumban és a peroxiszómában lokalizálódik, azonban a szterinek és az ubikinon szintézise itt is elkülönül. Növényekben a karotinoidok a kloroplasztisban, az ubikinon és a szterinek a mitokondriumokban vagy a citoszolban szintetizálódnak. A *M. circinelloides*-szel rokon, ugyancsak karotintermelő *Phycomyces blakesleeanus*-ban és *Blakeslea trispora*-ban megfigyelték a különböző izoprén származékok szintézisének kompartmentalizációját. Az ubikinon és ergoszterin azonos, míg a karotinoidok külön kompartmentben szintetizálódnak, már az acetil-koenzim A kondenzációjától, azaz a mevalonsav út kezdeti lépéseitől kezdve (Bejarano és mtsai., 1992; Kuzina és mtsai., 2006). Ezen szakirodalmak alapján célszerűnek gondoltuk megvizsgálni, hogy a *M. circinelloides*-ben található három HMG-KoA reduktáz közt van-e eltérés a lokalizációjukat, ebből következően, a munkamegosztásukat illetően az izoprenoidok bioszintézisében.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a HmgR3 a sejten belül csak az endoplazmatikus retikulumban lokalizálódik, míg a HmgR2 az endoplazmatikus retikulumban és egyéb kisméretű kompartmentekben is. Ez utóbbiak azonosítása érdekében további vizsgálatok szükségesek. Jelenlegi kutatásaink során olyan vektorkonstrukciót építettünk, amelyben a specifikus karotin bioszintézisben résztvevő likopin cikláz/fitoén szintáz (carRP) enzim transzmembrán régióit kódoló génszakaszt sárga fluoreszcens fehérje (*yfp*) génjével fúzionáltattuk. Az így kifejeztetett fúziós fehérjék esetleges kolokalizációja a HmgR2- vagy HmgR3-GFP-vel magyarázatot adhat ezen enzimeknek a karotinok szintézisében betöltött szerepére.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munka a *Mucor circinelloides*, karotin termelő járomspórás, fonalas gombában zajló izoprenoid bioszintézis út molekuláris biológiai feltérképezésének teljességéhez járul hozzá. Munkánk során a fő célkitűzésünk, a *M. circinelloides* három HMG-KoA reduktázának sejten belüli lokalizációjának a vizsgálata volt.

A kísérletek elvégzéséhez elsődlegesen szükséges volt olyan vektorkonstrukciók létrehozása, amelyekben az egyes gének transzmembrán régióit kódoló DNS szakaszokat a zöld fluoreszcens fehérje génjével építettük össze. A fehérjék lokalizációjában kulcsszerepet játszó transzmembrán régió segítségével lehetőség nyílt a reduktázok lokalizációjának nyomon követésére konfokális fluoreszcens mikroszkópia segítségével. Ezen vektorokkal történő transzformáció után a gombasejtekben, hifákban, a leoltásuktól számított 48 órán belül, a HmgR2 és HmgR3 fehérje esetében detektálható volt a zöld fluoreszcens fehérje. Az enzimek sejten belüli helyzetének pontosítása érdekében célul tűztük ki az endoplazmatikus retikulummal és mitokondriummal mutató esetleges kolokalizáció elemzését is. A GFP-t kifejező transzformáns törzsekben az endoplazmatikus retikulum intracelluláris helyzetének konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatát az Er-Tracker Red, a mitokondriumét pedig a MitoTracker Red FM fluoreszcens festékek segítségével végeztük.

Kísérleti munkánk eredményeként elmondható, hogy sem a HmgR2, sem a HmgR3 nem mutatott a mitokondriummal kolokalizációt, viszont mindkét esetben egyértelmű volt a fúziós termékek jelenléte az endoplazmatikus retikulumban. Emellett a HmgR2 esetében a GFP fluoreszcenciája az endoplazmatikus retikulumon kívül egy kisméretű kompartmentben is megfigyelhető. *Phycomyces*-ben és *Blakeslea*-ban ismert, hogy az egyes izoprén származékok, mint például a karotinok is, a sejten belül elkülönült kompartmentben szintetizálódnak, ezért annak tisztázása érdekében, hogy a *Mucor*-ban megfigyelt kisméretű kompartmentek milyen szerepet töltenek be, további vizsgálatokat végzünk.