

XXXII.OTDK

Biológia szekció

HMG-KoA reduktáz gének kifejeződése a *Mucor circinelloides* járomspórás gomba anaerob tenyésztése során

Tóth Dóra Erika

Biológus szak

I. évfolyam M.Sc.

Témavezető: Dr. Papp Tamás

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

2015

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1. Járomspórás gombák (Mucoromycotina) általános jellemzői	4
2.2. A terpén bioszintézis	4
2.3. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A redukáz	6
2.4. A <i>M. circinelloides</i> HMG-KoA redukázai	8
3. CÉLKITŰZÉSEK	10
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
4.1. Felhasznált törzsek	11
4.2. Alkalmazott táptalaj/tápoldat	11
4.3. Anaerob tenyésztési körülmények	11
4.4. Genomi DNS kivonása <i>M. circinelloides</i> ből	11
4.5. Agaróz gélelektroforézis	12
4.6. Valósídejű kvantitatív reverz transzkripció PCR (qPCR)	
kísérletek	12
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	14
5.1. A HMG-KoA redukáz gének kifejeződésének összehasonlítása aerob és anaerob körülmények közt	14
5.2. A HMG-KoA redukáz gének kifejeződése különböző szénforrásokon aerob és anaerob körülmények között	16
5.3. Különböző tenyésztési hőmérsékletek hatása a gének kifejeződésére aerob és anaerob körülmények között	19
5.4. Só stressz hatása a gének kifejeződésére aerob és anaerob körülmények között	21
6. ÖSSZEFOGLALÁS	23

1. Bevezetés

A Mucoromycotina altörzsbe tartozó járomspórás gombát, a *Mucor circinelloides*-t gyakran alkalmazzák a karotin bioszintézis genetikai, valamint biokémiai folyamatainak tanulmányozására. A karotinoidok terpén típusú vegyületek. A terpének és származékaik szintézise gombákban egy közös útvonalon, az acetát-mevalonát útvonalon keresztül történik, melynek központi lépése a 3-hidroxi-3-metilglutaril konezim A mevalonsavvá történő átalakulása. A redukciós lépés határozza meg a folyamat sebességét, melyet a *hmgR* gének által kódolt HMG-KoA reduktáz katalizál. E gének száma élőlényenként eltérő lehet. A több gén kópiával rendelkező élőlényekben megfigyelték, hogy a gének kifejeződése eltérő szabályozás alatt állhat, valamint a szerepük is különbözhet az egyes élettani folyamatok során. A *M. circinelloides* genomja három HMG-KoA reduktáz gént tartalmaz, melyek a következők: a *hmgR1*, *hmgR2* és a *hmgR3*.

Tanszékünkön korábban izolálták a három gént, és vizsgálták a karotinoid bioszintézisében betöltött szerepüket, valamint a gének kifejeződését különböző körülmények között aerob környezetben.

Mivel a *M. circinelloides* élesztő morfológiát felvéve képes növekedni oxigénmentes körülmények között is, így célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a már említett gének kifejeződését anaerob környezetben is. Eltérő szénforrásokat, tenyésztési hőmérsékleteket valamint só koncentrációkat alkalmaztunk és vizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak a gének kifejeződésére. Azt az eredményt kaptuk, hogy a gének anaerob környezetben is kifejeződnek, de eltérő mértékben. A *hmgR1* gén anaerob körülmények közt gyakorlatilag nem fejeződött ki. Összehasonlítva eredményeinket a korábbi aerob környezetben végzett kísérletek eredményeivel, azt tapasztaltuk, hogy a *hmgR2* gén transzkripciója volt a legerőteljesebb.

Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a *hmgR2* és *hmgR3* gének játsszák a legfontosabb szerepet az általános terpén bioszintézis folyamatában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Járomspórás gombák (Mucoromycotina) általános jellemzői

A Mucoromycotina altörzsbe tartoznak a hagyományosan járomspórás gombáknak nevezett csoportok: Mucorales, Mortierellales és az Endogonales. A Mucoromycotina gombacsoport tagjainak nagy része elhalt növényi maradványokon élő, szaprotróf szervezet. Néhány faj viszont parazita életmódot folytat. Sejtfalukat kitin és kitozán alkotja. A hifákban általában nincs harántfal, azaz a telepek cönocitikus fonalakkból állnak, viszont a sporangiumok kialakulása során keletkeznek válaszfalak. Néhány csoportjuk morfológiai dimorfizmust mutat. Az ilyen gombák a környezeti hatásoknak megfelelően felvehetnek fonalas morfológiát, valamint növekedhetnek élesztőszerűen is. A nevüket az ivaros szaporodás során létrejövő járomspóráról (zigospóra) kapták.

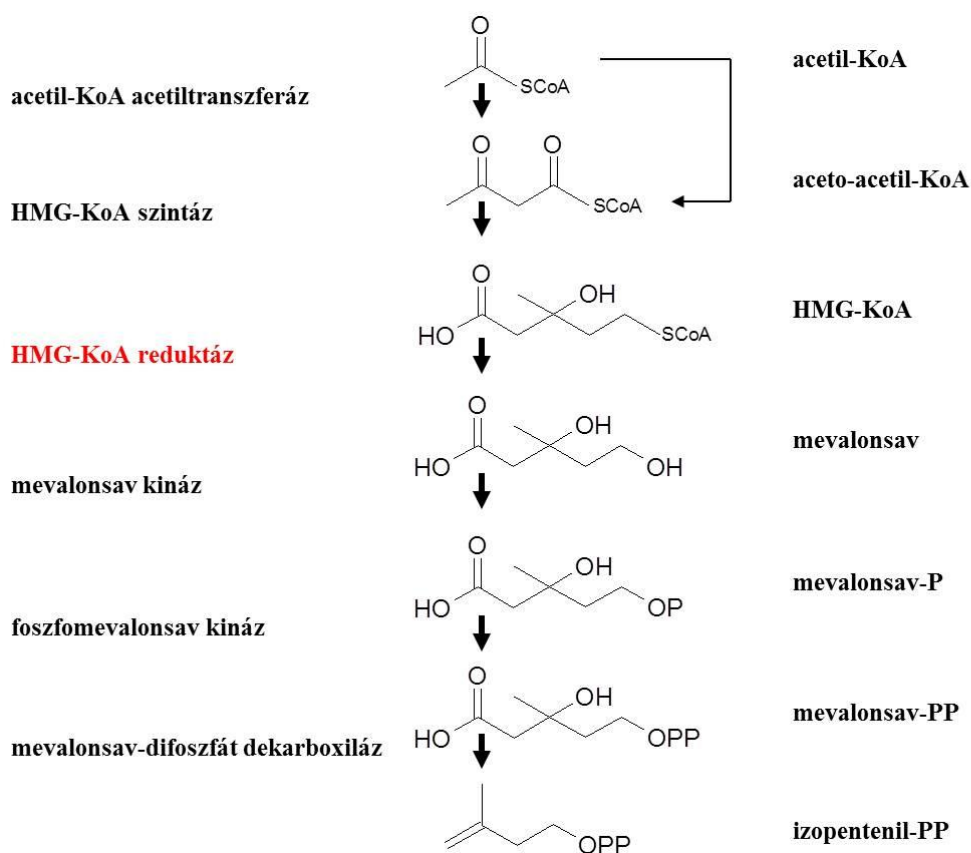
A karotin bioszintézis kutatásában fontos szerepük van a járomspórás gombáknak, különösen a Mucorales rend tagjainak. Előnyük, hogy gyorsan nagy tömegű hifa képzésére képesek. Korábban végzett kísérletek alapján több szervezet is jó karotin termelőnek bizonyult, ilyen a *Blakeslea trispora*, a *Phycomyces blakesleeanus* és a *Mucor circinelloides*. Viszont sem a *P. blakesleeanus* sem pedig a *B. trispora* esetében nem áll rendelkezésre megfelelő genetikai transzformációs rendszer, így a karotin termelés befolyásolására irányuló lehetőségek korlátozottak. Munkánk során ezért a *M. circinelloides*-t használtuk modellorganizmusként, mert e gomba vizsgálatához jól működő transzformációs rendszerrel, valamint nagyszámú mutáns törzzsel rendelkezünk.

2.2. A terpén bioszintézis

A terpének olyan vegyületek, amelyek izoprén egységekből épülnek fel. Származékaikat terpenoidoknak nevezzük, melyek szénhidrogéneket és oxigént tartalmaznak. Hatalmas csoport, melybe számos vegyület tartozik, például a karotinoidok (színanyagok), sejtmembránok alkotóelemei (koleszterin), hormonhatású vegyületek (gibberellin), feromonok (grandizol), anyagcsere termékek (triterpének).

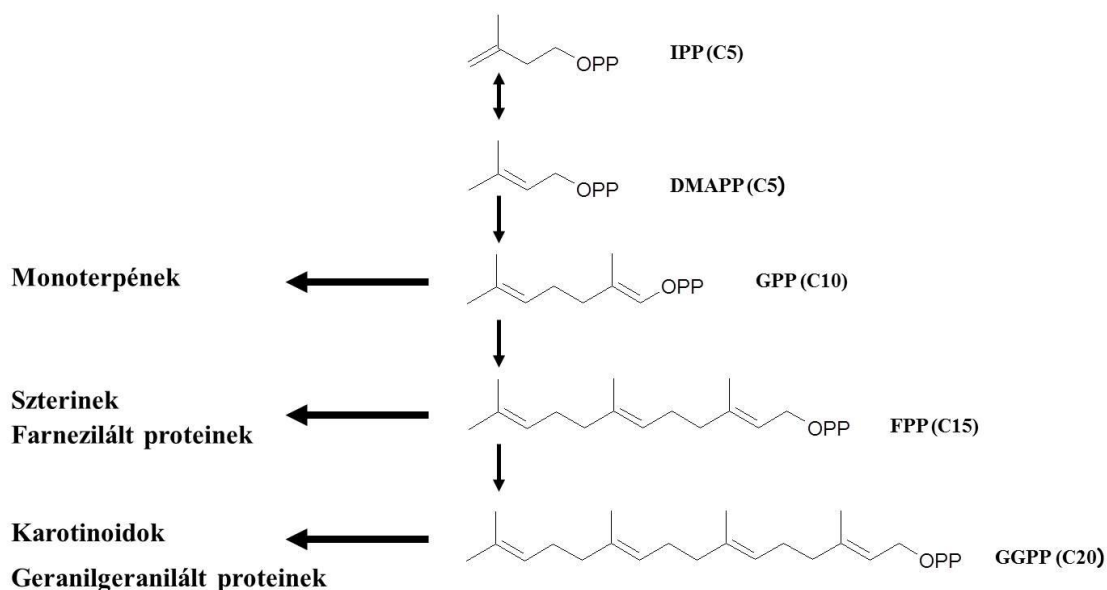
Bioszintézisük gombákban az acetát-mevalonát útvonalon keresztül történik (**1. ábra**). Az útvonal elején két acetil-koenzim A acetiltranszferáz segítségével, acetoacetil-koenzim A-vá kondenzálódik. Ezután egy harmadik acetil-KoA segítségével létrejön a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA). Ez fog tovább alakulni mevalonsavvá, a redukciót pedig a HMG-KoA reduktáz katalizálja. Ez a reakció a bioszintézis egyik kulcslépése, ugyanis ez határozza meg a folyamat sebességét. A mevalonsavból először 5-

foszfomevalonsav, majd 5-pirofoszfomevalonsav keletkezik. Ez alakul tovább öt szénatomos izopentenil pirofoszfáttá (IPP). A keletkezett IPP az izoprénvázas vegyületek építőegysége.



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

Tehát a mevalonsav útvonal eredményezi az IPP kialakulását, amely az izoprén bioszintézis útvonal során dimetilalil-pirofoszfáttá (DMAPP) alakul át (**2. ábra**). A DMAPP egy IPP egységgel kondenzálódik, melynek következtében tíz szénatomos geranil pirofoszfát (GPP) jön létre. Majd hosszabbodik a szénlánc újabb IPP egység bekapcsolódásával, amelynek eredménye a tizenöt szénatomos farnezil pirofoszfát (FPP). Újabb IPP egység kondenzációjával jutunk el a húsz szénatomos geranilgeranil-pirofoszfáig (GGPP). Ezek a lépések eddig a bioszintetikus út "nem-specifikus" részét képezik. Ennek során alakulnak ki a már említett prekursor vegyületek: a GPP-a monoterpének, a FPP- a szteroidok, szetrolok és triterpének, a GGPP- pedig a karotinoidok és driterpének szintézisének kiindulási vegyülete. A FPP és a GGPP emellett fontos szignál és szabályozó fehérjék prenil csoportjait alkotják, valamint a FPP prekursorból keletkező ergoszterin a gomba sejtmembrán egyik fontos alkotórésze.



2. ábra Az izoprén bioszintézis útvonala, amely során öt szénatomos izoprén egységek kapcsolódásával az izoprénváz növekszik. Az újonnan létrejött vegyületek pedig, különböző terpének bioszintézisének a kiindulási anyagai.

Az útvonal "karotinoid-specifikus" részében két GGPP kapcsolódása során egy szintelen fitoén keletkezik. A fitoén dehidrogenáz közreműködésével létre jön a likpoin, melynek a két vége jonon-gyűrűvé záródik, és így β -karotinná alakul. A keletkező β -karotin lesz a fő terméke a járomspórás gombák bioszintézisének.

A karotinoidok bioaktív pigmentek, szerepük van a fotoszintézisben, valamint nélkülözhetetlenek a heterotróf szervezetek számára. A karotinoidok közé tartozik a karotin, amely nyolc darab izoprén egységből épül fel. Két közismert formája: az alfa- és a béta-karotin, amik a végükön lévő gyűrűben található kovalens kettős kötés helyzetében különböznek. A β -karotin az elterjedtebb, de mind két forma egyaránt jótékony hatással bír az emberi szervezetre. Antioxidánsként is hatnak (Burton 1989; Paiva és Russel 1999; Naguib 2000), megkötik a szabad gyököket, így csökkentve a rákos megbetegedések kialakulását.

2.3. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A redukáz

A HMG-KoA redukciója, azaz mevalonsavvá történő átalakulása, az egyik legfontosabb lépése a terpén bioszintézisének, ugyanis ez határozza meg az útvonal sebességét. Ezt a reakciót az úgynevezett HMG-KoA redukáz katalizálja, amely egy NADP koenzimmel működő oxidoreduktáz.

Több eukarióta élőlényben is jellemezték azokat a géneket melyek a HMG-KoA-reduktázt kódolják, például: *Arabidopsis thaliana* (Caelles és mtsi. 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (Basson és mtsi. 1988), *Drosophila melanogaster* (Gertler és mtsi. 1988).

Emlősökben, növényekben, gombákban eltérő számban találhatóak meg ezek a gének. A járomspórás gombák között is találtak kópiaszámbeli eltérést. Míg a *Mucor mucedo* két gént hordoz genomjában, addig a *Rhizomucor miehei* (Lukács és mtsi. 2008) csak egyet. De előfordulnak olyan fajok is, melyek három gént is tartalmaznak, ilyen a mi modellorganizmusunk is, a *M. circinelloides* (Lukács és mtsi. 2008).

A HMG-KoA reduktáznak két típusa van. Az I. típus főként az eukariótákban, míg a II. típus az eubaktériumokban fordul elő. A két típus felépítése különbözik. Az I. típus számos transzmembrán régiót tartalmaz, míg a bakteriális HMG-KoA reduktázból hiányoznak. A transzmembrán domének száma fajon belül is változhat, *R. miehei*-ben csak 7, viszont a *P. blakesleeanus*-ban 8 transzmembrán domént azonosítottak. Az enzim szintjének poszttranszlációs szabályozásában a hidrofób N-terminális régió vesz részt, amelyben egy szterol érzékelő domén található (SSD, *sterol sensing domain*) (Loftus és mtsai. 1997, Brown és Goldstein 1999, Davies és Ioannou 2006). A hidrofil C-terminális domén az enzim katalitikus aktivitásáért felelős (Hampton és Rine 1994). A hidrofób és hidrofil doméneket egy úgynevezett „linker” régió köti össze. Ez egy viszonylag rövid szakasz, a *R. miehei* esetében mindössze 53 aminosav hosszú.

A HMG-KoA reduktáz regulációja több szinten történhet. Működését befolyásolják a transzkripció, transzláció, poszttranszlációs módosítások, valamint az izoprének kialakulása során keletkező közti és végtermékek (pl. FPP, GGPP) mennyisége is hatással lehet az enzimre (Goldstien és mtsi. 1980). Megfigyelték, hogy ha *S. cerevisiae*-ben, az említett végtermékek közül valamelyik megjelenik, akkor az enzim kisebb mennyiségben lesz jelen. Tehát a végtermék negatívan szabályozza a HMG-KoA reduktázt kódoló gén kifejeződését. Emlősökben azt figyelték meg, hogy kevesebb mennyiségű enzim jelenlétében apoptózis történt, melyet a farnezol indukált. Valamint a gátolt HMG-KoA az endoplazmatikus retikulum stressz válaszát váltja ki, amely szintén apoptózist idéz elő (Joo és Jetten 2010).

Az enzim lokalizációja eltérő lehet. Emlős sejtekben az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjához kötött (Breitling és Krisans 2002). Az egyes fajok génjei eltérő számú fehérjét kódolhatnak, amelyek funkciójukban, szabályozásukban és lokalizációjukban is eltéréseket mutathatnak. Az extrémofil *Hortaea werneckii* gombában pl. két izoformát azonosítottak. Egyik forma a mitokondriumhoz kötött, a másik forma pedig az ER-hez kapcsolódik (Vaupotic és Plemenitas 2007). Ugyancsak erre példa egy laboratóriumi modellszervevény is az *A. thaliana*, melyben három izoenzim van jelen. Növényekben a mitokondriumhoz, az ER-hez és a plasztiszhoz kötődhet a fehérje (Leivar és mtsi. 2005, Stermer és mtsi. 1994).

Ahogy már korábban említettem a HMG-KoA reduktáznak kiemelkedő szerepe van az izoprén bioszintézisben. A keletkezett termékek, mint a karotinoidok, növényi hormonok, vagy a gombák számára nélkülözhetetlen ergoszterol, mind szerepet játszanak a fejlődésben, növekedésben és az anyagcserében. Viszont az enzim működésének gátlása, a sejtek apoptózisához vezethet. A HMG-KoA reduktáz kompetitív inhibitorai a sztatínok. A sztatínok szerkezete hasonló a HMG-KoA reduktáz szerkezetéhez, ebből kifolyólag képesek az enzimhez kapcsolódni. Ez a kötődés gátolja a mevalonsav átalakulást, ezáltal az izoprén bioszintézis útvonalat is.

Kísérleteket végeztek arra, hogy milyen hatással vannak az enzimre a különböző körülmények, és ez hogy hat ki a vizsgált törzsekre. Erre alkalmas törzs volt a só-érzékeny *S. cerevisiae*. Azt az eredményt kapták, hogy alacsony illetve magas só koncentráció mellett, jóval megnőtt az enzim aktivitása az optimális körülményekhez képest. A kísérlet nem csak az aktivitás megfigyelésére irányult, hanem a fehérje mennyiségére is. Azt tapasztalták, hogy a fehérje mennyisége több volt, mint optimális körülmények között (Vaupitiupitič és mtsi. 2008). Ez azt eredményezi, hogy az enzim növeli a gomba só tűrő képességét. Olyan törzsekkel is végeztek kísérleteket, amelyek nem képesek karotinoidokat termelni, ilyen a *Candida utilis*. Azonban ezek a gombák az izoprén szintézis útvonal prekursorait tartalmazzák. Sikertült létrehozni olyan törzseket melyek képesek karotinoidokat (β -karotin, likopin) termelni. Ezt úgy érték el, hogy a *C. utilis* bakteriális eredetű génekkel transzformálták (Misawa és Shimada 1997). Majd a *C. utilis hmgR1* génjét autonóm replikálódó plazmidon karotin termelő törzsbe juttatták, amely azt eredményezte, hogy a *hmgR1* kópiaszáma megnőtt és a géndózis hatás eredményeképpen termelt karotin mennyisége is fokozódott. Ugyancsak sikerült fokozni a karotin mennyiségét, egy másik kísérletben is, ahol a termelő törzs egy transzformáns *S. cerevisiae* volt. Ebben az esetben a karotin növekedés, a *C. utilis* HMG-KoA reduktáz katalitikus domén kifejeztetésének volt köszönhető (Verwaal és mtsi. 2006).

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

A *M. circinelloides* genomja 3 *hmgR* gént tartalmaz: *hmgR1*, *hmgR2*, *hmgR3*. Korábban már megkezdődtek ezeknek a géneknek a vizsgálatai tanszékünkön. A gének által kódolt fehérjék jellemzőit az **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat A *M. circinelloides* HMGR1, HMGR2, HMGR3 fehérjéinek jellemzői (Nagy és mtsi. 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)

A három gén eltérést mutat a transzmembrán hélixek számában, a molekula tömegben, valamint a NAD(P)H és a HMG kötésért felelős konzervált helyekben is. A HMGR3 második HMG kötő helyén felfedezhető egy Val-Ile csere, hasonló cserét láthatunk a HMGR1 második NAD(P)H kötő helyén is, ahol pedig egy Ile-Val csere történt. Különbség van az enzim szabályozásáért felelős SSD-ben is. A HMGR1 SSD 11 aminosavval hosszabb, mint a HMGR2 SSD, viszont 12 aminosavval rövidebb, mint a HMGR3 SSD. Ezek az aminosav eltérések is közreműködhetnek abban, hogy a fehérjék poszt-transzlációs szabályozása és szterol érzékelő képessége is különbözik.

3. Célkitűzések

Néhány gombafaj, mint a *M. circinelloides* vagy a *S. cerevisiae* képes aerob és anaerob környezetben is növekedni, úgynevezett dimorf gombák. A dimorfizmus azt jelenti, hogy a gomba a körülmények függvényében, képes fonalas és élesztőszerű morfológiát is felvenni. Az alaki változások hátterében az egyes gének kifejeződésében fellépő különbségek állnak. A *S. cerevisiae* genomja 2 *hmgR* gént tartalmaz, melyek eltérő módon fejeződnek ki oxigén tartalmú, illetve oxigénmentes közegben. A *hmgR1* gén transzkripciós szintje magasabb aerob környezetben, mint anaerob körülmények között, ezzel szemben a *hmgR2* gén főként anaerob körülmények között fejeződik ki.

Korábbi kísérletek során, tanszékünkön vizsgálták a *M. circinelloides* három *hmgR* génjének kifejeződését aerob környezetben. A gomba tenyésztése során mérték a gének relatív transzkripciós szintjét eltérő szénforrások, különböző hőmérsékletek és só koncentráció, továbbá eltérő oxigéntenziók mellett.

Ezen eredmények ismeretében jelen munka során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a három izogén kifejeződését anaerob tenyésztés esetén is. Ezért a következő konkrét kísérletek elvégzését terveztük:

A három *M. circinelloides* *hmgR* gén relatív transzkripciós szintjének meghatározása anaerob körülmények között kvantitatív PCR (qPCR) segítségével

- (1.1) eltérő szénforrások,
- (1.2) eltérő tenyésztési hőmérsékletek, valamint
- (1.3) eltérő só koncentrációk alkalmazása esetén,

valamint az így kapott eredmények összehasonlítása a korábbi, aerob körülmények között végzett kísérletek eredményeivel.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált törzsek

A *hmgR* gén transzkripciójának vizsgálatához, a *Mucor circinelloides* CBS 277.49 *leuA⁻* és *pyrG⁻* mutáns törzsét (MS12-t) használtuk.

4.2. Alkalmazott táptalaj/tápoldat

<u>YNB táptalaj/tápoldat:</u>	1%glükóz
	0,15% (NH ₄) ₂ SO ₄
	0,15% Na-L-glutaminát
	0,05% Yeast Nitrogen Base
	0,05% uracil és leucin
	2% agar, szilárd táptalaj esetén

A szénforrások tesztelése során a YNB tápoldatban a glükóz helyett a tesztelni kívánt szénforrást adtuk ugyancsak 1%-os arányban.

4.3. Anaerob tenyésztési körülmények

YNB tápoldatba (30ml) 10⁵ spóra/ml lett leoltva. A tenyésztés ún. GasPak rendszerben (GasPak EZ Gas Generating Container System; BD), lezárt tenyésztőedényben történt. Eltérő körülmények között 2 napig növesztettük a gombákat. A körülmények a következők voltak: különböző hőmérséklet (20 °C, 25 °C, 30 °C és 35 °C), különböző szénforrások (glükóz, maltóz, trehalóz, nátrium-acetát, dihidroxi-aceton), különböző só koncentráció (kontroll, 1%, 2%, 3%).

4.4. Genomi DNS kivonása *M. circinelloides*ből

A gombákat uracillal és leucinnal kiegészített YNB csészéken neveltük és a micéliumokat folyékony nitrogénben tártuk fel. A feltárás után a MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit-et használtuk a gyártó utasítása szerint.

4.5. Agaróz gélelektroforézis

A DNS minták elektroforézisét 0,8%-os agaróz/TAE gélen (40 mM Tris-ecetsav, pH 7,6; 1 mM Na₂EDTA) végeztük (80V). Majd etídium-bromidos festést követően (0,5 µg/ml) a DNS detektálása UV-fényben történt. A molekulák méretének meghatározásához 1 kb-os molekulasúly markert (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas) használtunk.

4.6. Valósídejű kvantitatív reverz transzkripció PCR (qPCR) kísérletek

RNS kivonáshoz az E.Z.N.A. Total RNA Kit-et (Omega Bio-Tek) használtuk a gyártó utasítása szerint. A valósídejű PCR vizsgálatokat CFX96 Real-Time Detection System (Bio-Rad) berendezéssel végeztük. A mintákat 96 lyukú platre (Bio-Rad) vittük fel, referencia génként a *M. circinelloides* aktin génjét (*act*) használtuk.

DNáz kezelés:

1 µg RNS
1 µl 10x-es puffer MgCl₂-al
kiegészítve 9 µl-re DEPC (dietil-pirokarbonát) kezelt vízzel
1 µl DNáz, RNáz mentes (1u/ µl, Fermentas)
30 perc inkubálás 37 °C-on, az inkubálást követően 1 µl 25mM EDTA hozzáadása után
10 perc 65 °C-on további inkubálás

A DNáz kezelést követően ellenőrző PCR összemérése a DNáz kezelés hatékonyságára.

cDNS szintézis:

A cDNS szintézishez RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításai szerint. A szintézishez a kithoz mellékelt random hexamer és Oligo(dT)₁₈ indítószekvenciákat használtuk.

Valósídejű PCR a cDNS mintákból:

A qPCR méréshez használt reakció elegyhez a Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)-t (Thermo Scientific) használtuk. A PCR reakciók összemérése specifikus indítószekvenciákkal történt. A relatív transzkripció szintek meghatározására a 2^{-ΔΔCt} számítási módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittgen 2001.).

A valósidejű PCR reakció körülményei a következők voltak:

10 µl SYBR Green
0,8 – 0,8 µl primer
8 µl cDNS
0,4 µl víz

A qPCR amplifikálás körülményei a következők voltak:

95°C, 3 perc
40 ciklus
95°C, 30 másodperc
60°C, 30 másodperc
72°C, 30 másodperc

A qPCR vizsgálatokhoz tervezett specifikus indítószekvenciák:

A *hmgR1* génre tervezett 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 tervezett 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 tervezett indítószekvenciák:

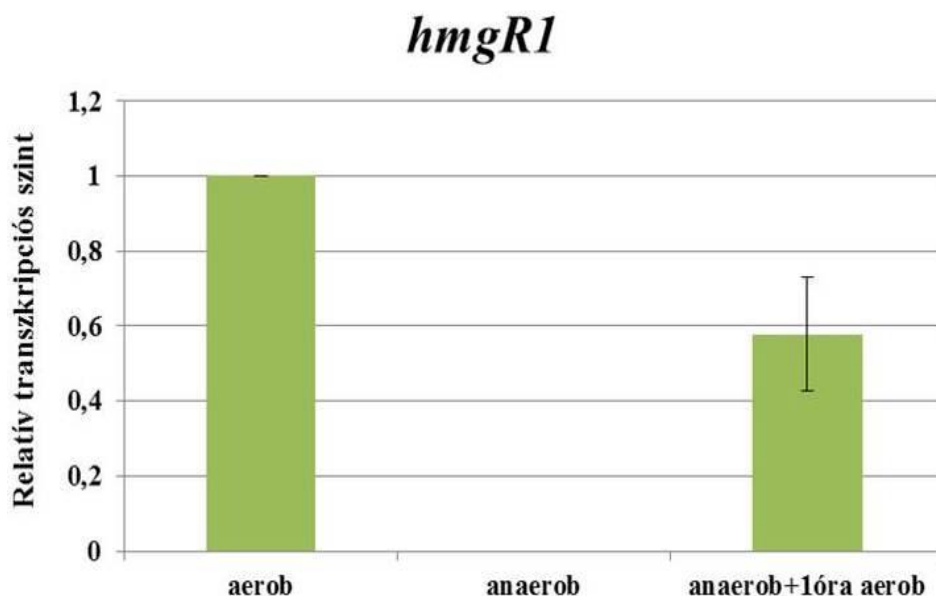
H3_RT_F: 5' GAA TCC AGT CTG TTG CCT CTC CA 3'

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

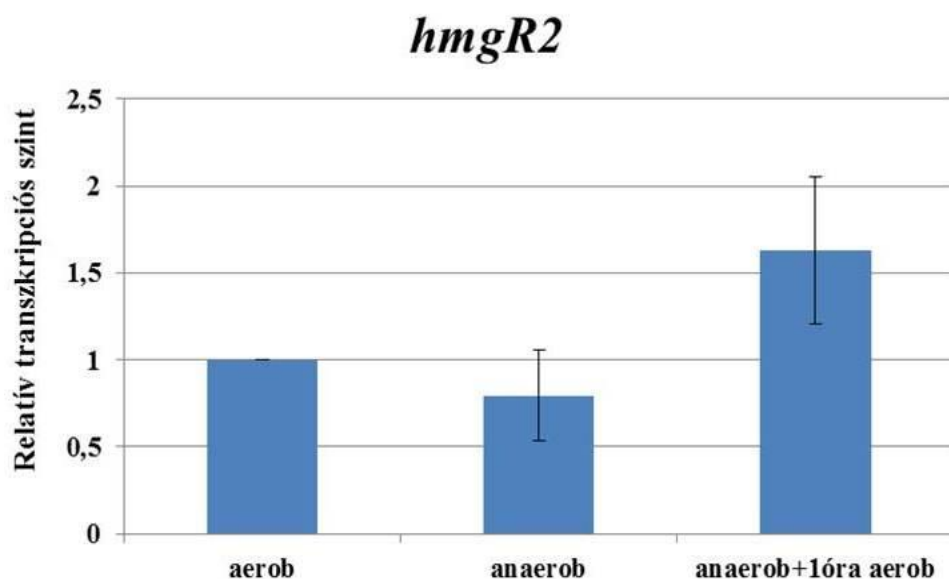
5. Eredmények és értékelésük

5.1. A HMG-KoA reduktáz gének kifejeződése aerob és anaerob körülmények közt

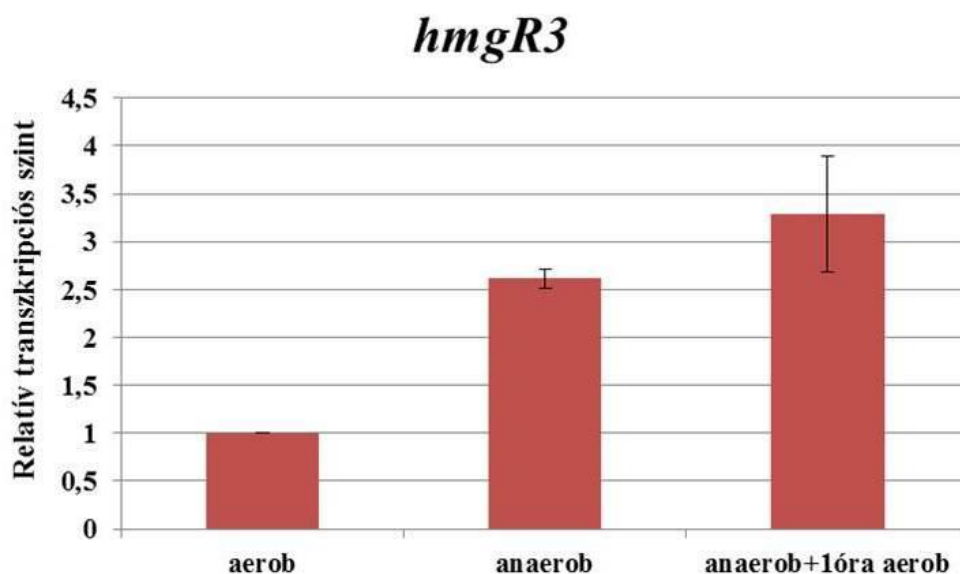
Tanszékünkön korábban már vizsgálták a három *hmgR* gén kifejeződését különböző tenyésztési körülmények között. A kísérlet során aerob, anaerob illetve oxigénmentes majd újra oxigén tartalmú környezetben tenyésztették az MS12 törzset (Nagy és mtsi. 2014). Anaerob körülmények mellett a gomba élesztőszerű morfológiát vesz fel, azonban ha ezt a tenyészetet újra aerob közegbe helyezzük, akkor az élesztőszerű sejtek ismét fonalasan kezdenek el nőni. Ehhez a váltáshoz 45-60 perc szükséges. Az eredmények azt mutatják, hogy a gének eltérő mértékben fejeződtek ki az egyes körülményeken. A *hmgR1* gén esetében, aerob környezetben mérték a legmagasabb transzkripciós szintet, a másik két körülményen pedig csökkent a gén aktivitása (**3. ábra**). Anaerob környezetben a *hmgR2* gén transzkriptum szintje nem változott szignifikánsan az aerob környezetben mért transzkripciós szinthez képest, a harmadik körülményen viszont jelentősen megnövekedett a gén aktivitás (**4. ábra**). A *hmgR3* gén aerob környezetben fejeződött ki legkevésbé, anaerob, illetve oxigénmentes majd újra aerob közegben a transzkripciós szint növekedett (**5. ábra**).



3. ábra Az MS12 törzs *hmgR1* génjének transzkripciós szintje aerob és anaerob körülmények közt, valamint anaerob majd 1 órán át aerob körülmények közt tenyésztve a törzset. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. Az aerob körülmények közt mért transzkripciós szintjét vettük 1-nek (Nagy és mtsi. 2014.).



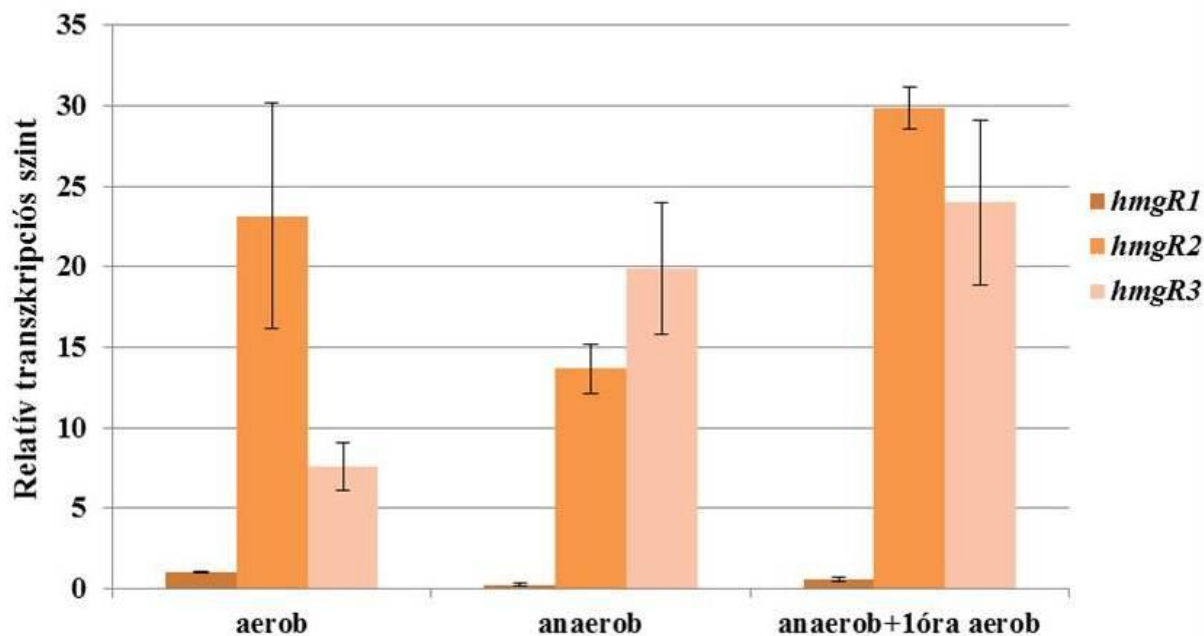
4. ábra Az MS12 törzs *hmgR2* génjének transzkripció szintje aerob és anaerob körülmények közt, valamint anaerob majd 1 órán át aerob körülmények közt tenyésztve a törzset. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. Az aerob körülmények közt mért transzkripció szintjét vettük 1-nek (Nagy és mtsi. 2014.).



5. ábra Az MS12 törzs *hmgR3* génjének transzkripció szintje aerob és anaerob körülmények közt, valamint anaerob majd 1 órán át aerob körülmények közt tenyésztve a törzset. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. Az aerob körülmények közt mért transzkripció szintjét vettük 1-nek (Nagy és mtsi. 2014.).

Összehasonlítva a gének relatív transzkripció szintjét azt tapasztalták, hogy a három izogén közül a *hmgR1* transzkripciója a leggyengébb. Valószínűleg a *hmgR1* gén csak aerob környezetben fejeződik ki, ugyanis anaerob környezetben nagyon késői Ct értéket kaptak,

éppen ezért jelen dolgozatba a *hmgR1* gén oxigénmentes környezetben mért transzkripció értékeit nem vettük figyelembe. Aerob környezetben a *hmgR2* gén fejeződik ki leginkább, ezzel szemben anaerob környezetben a *hmgR3* gén mutatta a legnagyobb aktivitást. A harmadik körülményen ahol először oxigénmentes, majd újra oxigén tartalmú közegben nevelték a gombát azt tapasztalták, hogy az összes gén transzkripció szintje növekedett, és ismét a *hmgR2* gén aktivitása volt a legnagyobb (6. ábra).

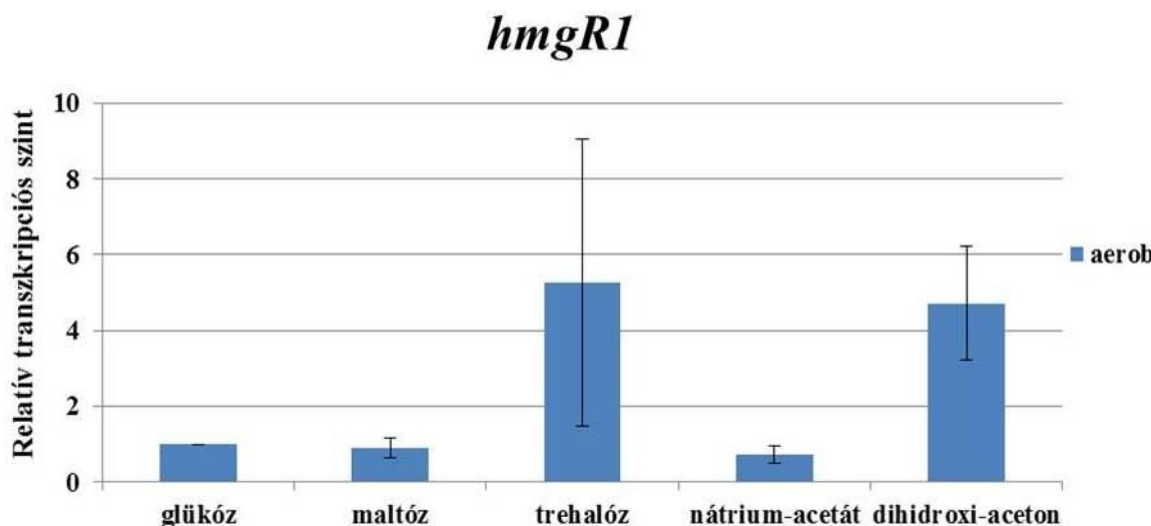


6. ábra Az MS12 törzs *hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3* géneinek transzkripció szintje aerob és anaerob körülmények közt, valamint anaerob majd 1 órán át aerob körülmények közt tenyésztve a törzset. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A *hmgR1* gén aerob körülmények közt mért transzkripció szintjét vettük 1-nek (Nagy és mtsi. 2014.).

5.2. A HMG-KoA reduktáz gének kifejeződése különböző szénforrásokon aerob és anaerob körülmények között

Az MS12 törzset leucinnal és uracillal kiegészített YNB tápoldatban tenyésztettük, melyben az 1% glükózt különböző szénforrásokra cseréltük. A szénforrások a következők voltak: maltóz, trehalóz, nátrium-acetát és dihidroxi-aceton. Korábbi, laborunkban végzett kísérletek igazolták, hogy ezek a szénforrások jó hatással vannak a karotinoid termelésre (Papp és mtsi. 2013). Amennyiben nátrium-acetátot vagy dihidroxi-acetont alkalmaztunk egyedüli szénforrásként, akkor a gomba anaerob környezetben nem volt képes növekedni, azonban aerob környezetben igen. A tenyésztést minden esetben 2 napon át végeztük.

Mindhárom gén esetében a glükózon kapott transzkriptum szintekhez hasonlítottuk a többi szénforráson kapott értékeket. Aerob környezetben a *hmgR1* gén transzkriptum szintje trehalózon és dihidroxi-acetonon volt a legnagyobb, a másik három szénforráson mért értékek között nem tapasztalható szignifikáns eltérés (**7. ábra**) (Nagy és mtsi. 2014).



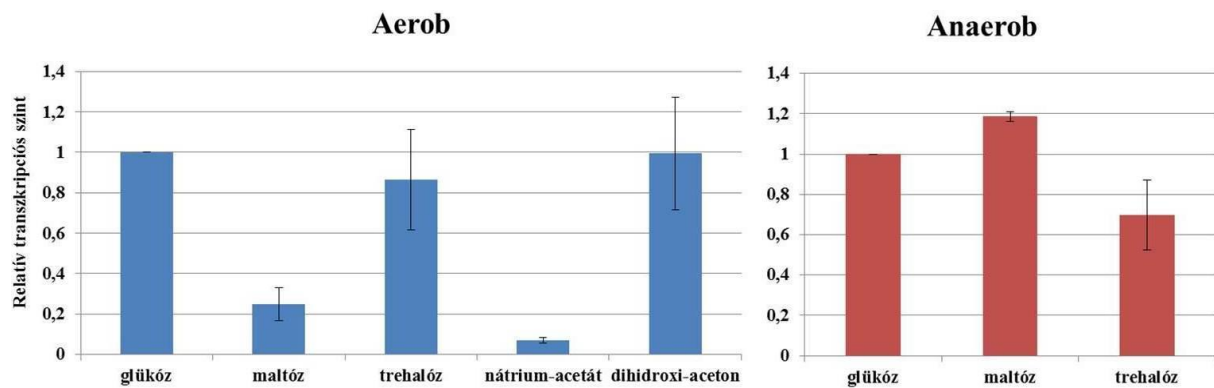
7. ábra Különböző szénforrások hatása a *hmgR1* gén transzkripciójára aerob környezetben. A diagramon a három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A glükózon kapott transzkriptum szintet vettük 1-nek (Nagy és mtsi. 2014).

A *hmgR2* gén relatív transzkripció szintje anaerob környezetben maltózon mutatta a legmagasabb értéket a glükózon mért értékhez képest, azonban aerob tenyésztés mellett a nátrium-acetáttal együtt a legalacsonyabb értéket. Trehalózon a gén relatív transzkripció értéke mind aerob, mind anaerob környezetben kevésbé változott a glükózon mért értékekhez képest (**8. ábra**).

A *hmgR3* esetében nem tapasztaltunk jelentősebb változást a gén relatív transzkripció értékeiben aerob és anaerob környezet mellett, azonban a **9. ábrán** látható, hogy aerob környezetben a gén kifejeződése trehalózon volt a legmagasabb, míg anaerob környezetben ezen a szénforráson mutatta a legkisebb értéket.

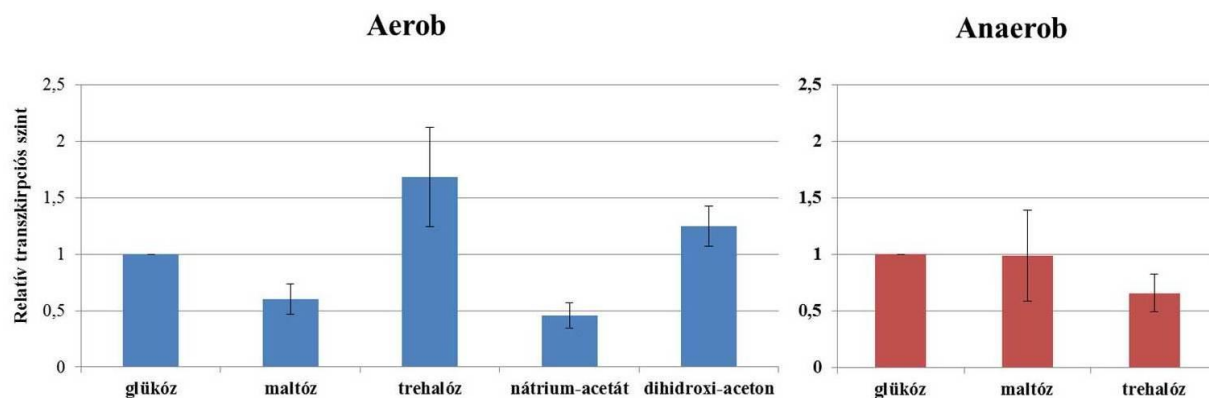
Az eredményekből látható, hogy a két gén kifejeződése a különböző szénforrásokon aerob és anaerob környezetben hasonló tendenciát mutat, azonban csak trehalózon és maltózon mutatnak nagyobb eltérést.

hmgR2



8. ábra Különböző szénforrások hatása a *hmgR2* gén transzkripciójára aerob és anaerob környezetben. A diagramon a három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A glükózon kapott transzkriptum szintet vettük 1-nek.

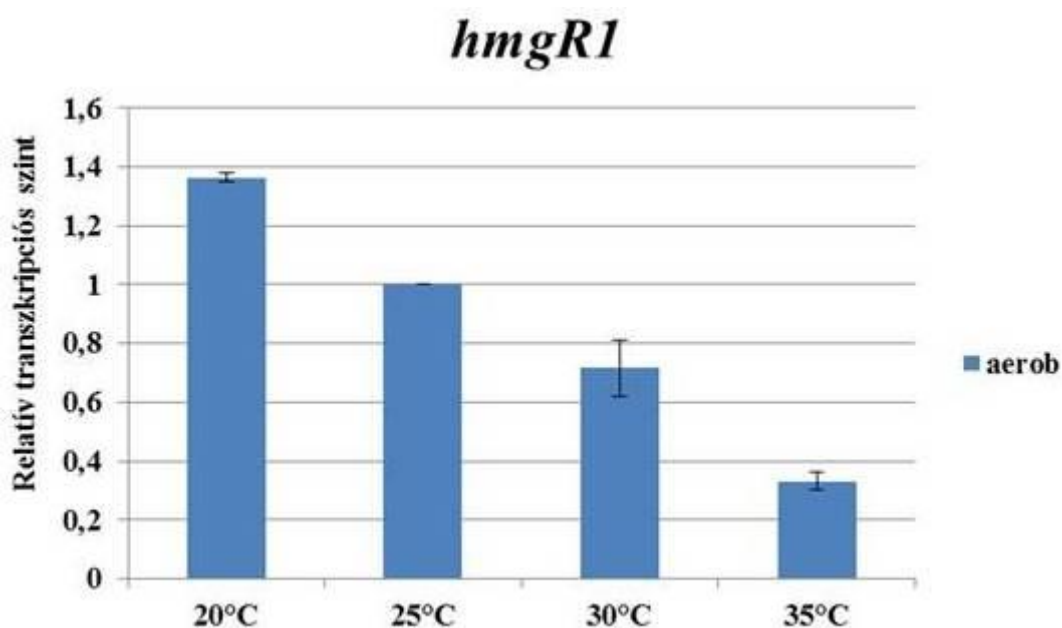
hmgR3



9. ábra Különböző szénforrások hatása a *hmgR3* gén transzkripciójára aerob és anaerob környezetben. A diagramon a három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A glükózon kapott transzkriptum szintet vettük 1-nek.

5.3. Különböző tenyésztési hőmérsékletek hatása a gének kifejeződésére aerob és anaerob körülmények között

Az MS12 törzset YNB tápoldatban 2 napon át tenyésztettük eltérő hőmérsékleten, 20, 25, 30 és 35 °C-on. Kontrollnak a 25 °C-on végzett tenyésztés eredményeit használtuk. Aerob tenyésztés során a *hmgR1* gén 20 °C-on mutatta a legnagyobb aktivitást, 30 illetve 35 °C-on pedig csökkent a transzkripció szintje a kontrollhoz képest (**10. ábra**) (Nagy és mtsi. 2014).



10. ábra A *hmgR1* gének transzkripciója: 20, 25, 30 és 35 °C-on aerob környezetben. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A 25 °C-on kapott transzkriptum szintet vettük 1-nek (Nagy és mtsi. 2014).

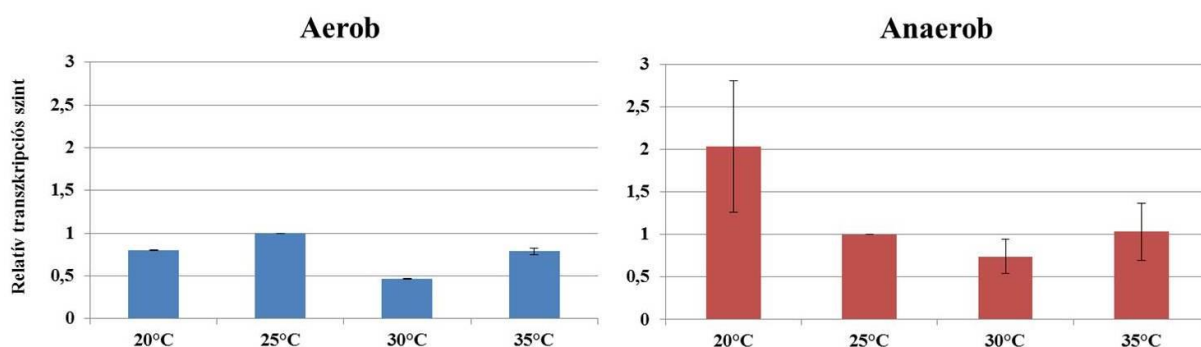
Anaerob környezetben a *hmgR2* gén relatív transzkripció szintje 20 °C-on volt a legmagasabb, 30 °C-on a legalacsonyabb, 35 °C-on pedig a kontrollhoz képest nem volt szignifikáns változás. Aerob környezetben is 20 és 25 °C-on fejeződött ki leginkább a gén, 30 illetve 35 °C-on pedig alacsonyabb transzkriptum szint figyelhető meg. Az eredményekből az látható, hogy aerob környezetben az optimális hőmérséklettől (25 °C) alacsonyabb/magasabb hőmérsékleten a gén relatív transzkripció szintje csökken, viszont anaerob környezetben megnő (**11. ábra**).

A *hmgR3* gén relatív transzkripció szintje 20 és 30 °C-on volt a legmagasabb, 35°C-on pedig a legalacsonyabb. Aerob környezetben is 20 °C-on volt legnagyobb a gén kifejeződése, viszont 30 °C-on lecsökkent, 35 °C-on pedig nőtt a kontrollhoz képest. Összehasonlítva a

kapott értékeket egyértelműen látszik, hogy a *hmgR3* gén aktivitása anaerob környezetben nagyobb, mint aerob környezetben (12. ábra).

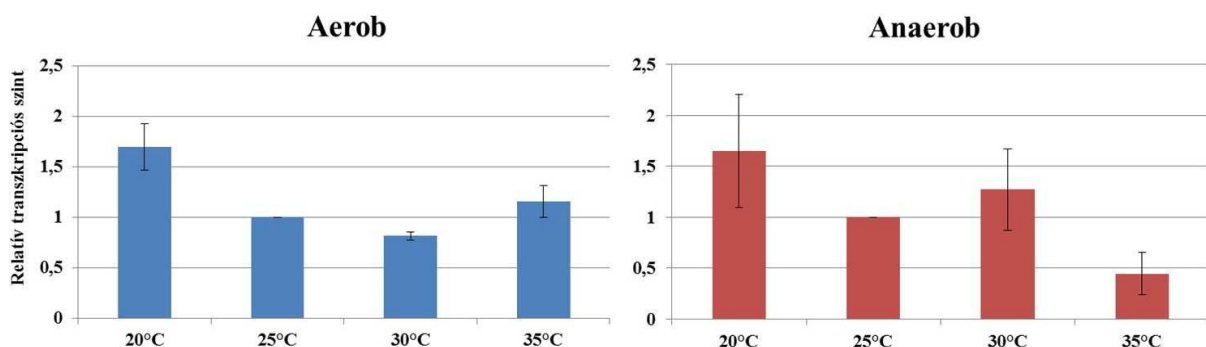
Mindkét gén esetében azt tapasztalhatjuk, hogy az optimális tenyésztési hőmérséklettől magasabb/alacsonyabb hőmérsékleten a relatív transzkripció szintek jelentősen változnak. A két ábrán látható, hogy a gének relatív transzkripció szintjei közül csak 35 °C-on tapasztaltunk különbséget.

hmgR2



11. ábra A *hmgR2* gének transzkripciója: 20, 25, 30 és 35 °C-on aerob és anaerob környezetben. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A 25 °C-on kapott transzkriptum szintet vettük 1-nek.

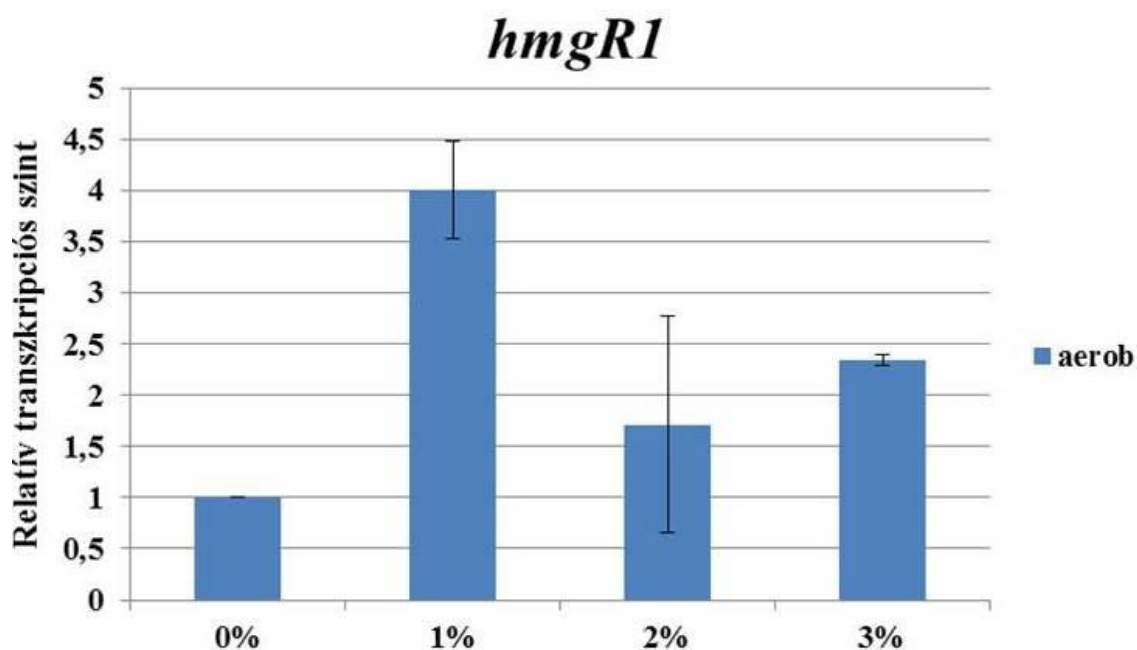
hmgR3



12. ábra A *hmgR3* gének transzkripciója: 20, 25, 30 és 35 °C-on aerob és anaerob környezetben. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A 25 °C-on kapott transzkriptum szintet vettük 1-nek.

5.4. Só stressz hatása a gének kifejeződésére aerob és anaerob körülmények között

Az MS12 törzset 2 napon keresztül, tenyésztettük eltérő (1, 2 és 3%) só (NaCl) koncentrációjú tápoldatban. A kontroll nem tartalmazott NaCl-t. Aerob környezetben a *hmgR1* gén kifejeződése a kontrollhoz képest a vizsgált só koncentrációk mellett növekedést mutatott, maximumát az 1% NaCl koncentrációt tartalmazó tápoldatban érte el (**13. ábra**) (Nagy és mtsi. 2014).



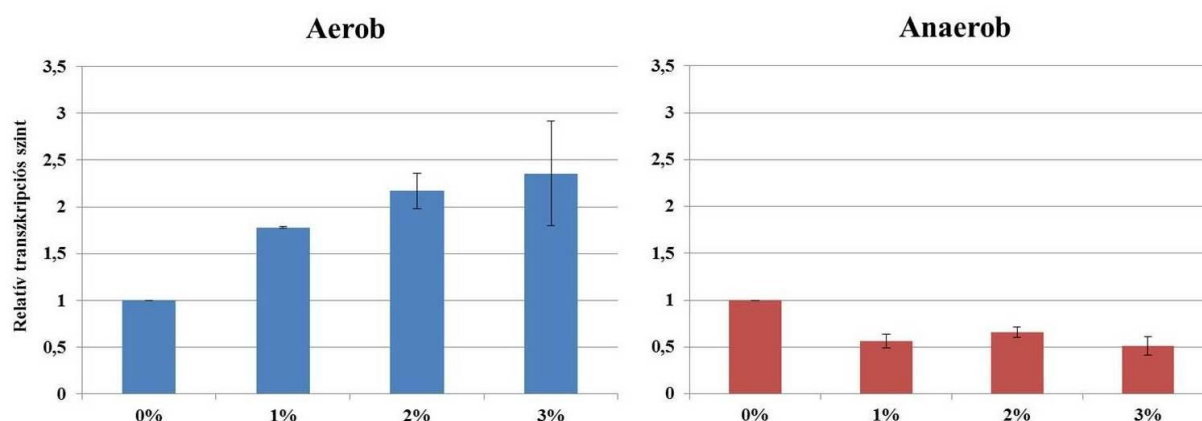
13. ábra Különböző só koncentrációk hatása a *hmgR1* gén relatív transzkripció szintjére aerob környezetben. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A sót nem tartalmazó tápoldatban kifejeződött gének értékét vettük 1-nek (Nagy és mtsi. 2014.).

A *hmgR2* gén kifejeződése teljesen eltérő aerob, illetve anaerob környezetben. Anaerob környezetben a növekvő só koncentrációval párhuzamosan csökkenő relatív transzkripció szinteket mértünk. Ezzel szemben aerob környezetben a növekvő só koncentrációval párhuzamosan egyre növekvő relatív transzkripció értékeket mutatott a gén (**14. ábra**).

A *hmgR3* gén esetében azt tapasztaltuk, hogy a só koncentráció változás jelentősen nem befolyásolja a gén kifejeződését sem aerob, sem anaerob körülmények között, ugyanis az eltérő só koncentrációkon mért transzkriptum szintek nem mutatnak szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest (**15. ábra**).

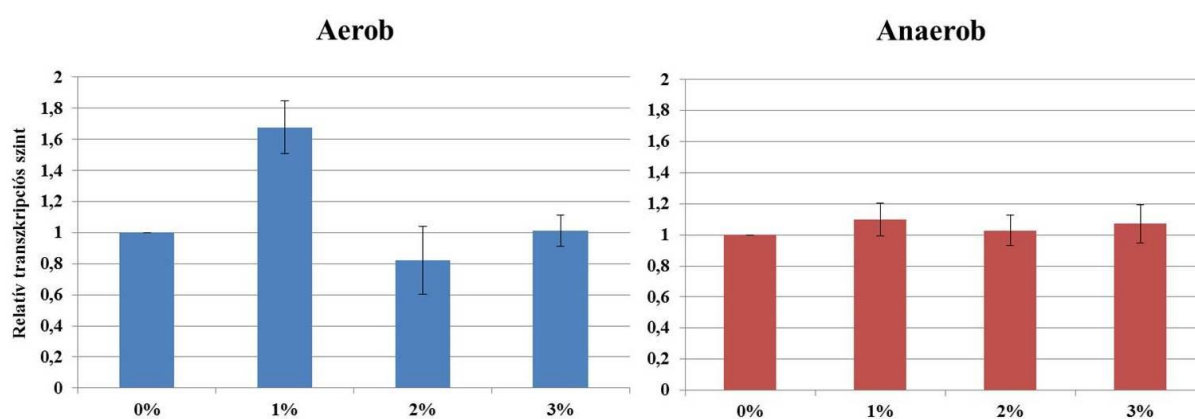
Kísérleteink alapján elmondható, hogy mind aerob, mind anaerob körülmények közt a *M. circinelloides hmgR2* génje mutatja a legerőteljesebb transzkripciót, és a gén kifejeződését a különböző tenyésztési körülmények megváltozása jelentősen befolyásolhatja. A *hmgR3* gén transzkripció szintje anaerob körülmények közt jelentősen megemelkedett az aerob tenyésztések során mérthez képest, ugyanakkor a környezeti változások a gén kifejeződését nagymértékben nem befolyásolták.

hmgR2



14. ábra Különböző só koncentrációk hatása a *hmgR2* gén relatív transzkripció szintjére aerob és anaerob környezetben. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A sót nem tartalmazó tápoldatban kifejeződött génnek értékét vettük 1-nek.

hmgR3



15. ábra Különböző só koncentrációk hatása a *hmgR3* gén relatív transzkripció szintjére aerob és anaerob környezetben. A diagramon három mérés eredményeiből számolt átlagértékek vannak feltüntetve. A sót nem tartalmazó tápoldatban kifejeződött génnek értékét vettük 1-nek.

6. Összefoglalás

Kísérleteink során a *M. circinelloides* MS12 törzsének három *hmgR* izogénjét vizsgáltuk. Célunk az volt, hogy a gének transzkripcióját oxigénmentes környezetben eltérő körülmények mellett vizsgáljuk. A kapott eredményeket a laborunkban korábban végzett kísérletek eredményeivel hasonlítottuk össze. Ezek a vizsgálatok szintén a *hmgR* gének kifejeződésére irányultak, azzal a különbséggel, hogy oxigén tartalmú környezetben tenyésztették a gombákat.

Vizsgálataink során különböző szénforrásokat (glükóz, maltóz, trehalóz, nátrium-acetát és dihidroxi-aceton), különböző hőmérsékleteket (20, 25, 30 és 35 °C) valamint különböző só koncentrációkat (0, 1, 2, 3 %) alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy anaerob tenyésztés során a gomba nem növekedett nátrium-acetátot és dihidroxi-acetont tartalmazó tápoldatban. A *hmgR1* gén transzkripciója nem volt bizonyítható anaerob tenyésztés során egyik vizsgált körülmény esetén sem. Aerob körülmények közt nevelt tenyészetben a *hmgR2* mutatta a legnagyobb, míg *hmgR1* a legkisebb relatív transzkripciós szintet, ugyanakkor anaerob környezetben a *hmgR3* gén fejeződött ki leginkább. Amennyiben az anaerob tenyészetet ismét aerob környezetbe helyeztük ismét a *hmgR2* kifejeződése volt a legerősebb. Különböző szénforrások alkalmazása során aerob körülmények között maltózon a *hmgR2* relatív transzkripciós szintje jelentősen lecsökkent, ezzel szemben anaerob tenyésztés során megnőtt. Jelentősebb változást a *hmgR3* gén aktivitásában nem tapasztaltunk, azonban aerob környezetben trehalózon mutatta a legmagasabb relatív transzkripciós szintet. Az eredményeink azt mutatják, hogy különböző hőmérsékleteken tenyésztve a törzset az optimális hőmérséklettől eltérő alacsonyabb vagy magasabb hőmérsékleten a *hmgR2* és *hmgR3* relatív transzkripciós szintjei jelentősen változnak. A legjelentősebb változást a *hmgR2* gén anaerob 20 °C-os tenyésztése mellett tapasztaltunk. Ebben az esetben jelentősen megnőtt a gén kifejeződése anaerob tenyésztés során. Vizsgáltuk a gének kifejeződését eltérő só koncentrációkon is. Oxigénmentes környezetben *hmgR2* gén relatív transzkripciós szintje só stressz hatására csökkent, aerob környezetben viszont megnőtt a NaCl-ot nem tartalmazó kontrollhoz képest. A *hmgR3* gén kifejeződésére pedig sem aerob, sem anaerob környezetben nem volt szignifikáns hatással a só stressz.

Kísérletünk alapján elmondható, hogy a *M. circinelloides* három *hmgR* génje közül a *hmgR2* fejeződik ki a legnagyobb mértékben és e gén válaszol leginkább az eltérő tenyésztési körülményekre, mind aerob, mind anaerob környezetben. Feltehetően tehát e gén termékének

van a legfontosabb szerepe az általános terpén bioszintézisében, valamint a külső környezeti feltételek megváltozásához való alkalmazkodásban. A *hmgR3* gén aktivitása az összes vizsgált körülményen alacsonyabb volt, mint a *hmgR2* géné, viszont transzkripció szintje anaerob körülmények között jelentősen megnőtt. A környezeti változások a *hmgR3* gén kifejeződését nagymértékben nem befolyásolják. Laborunkban végzett egyéb kísérletek során, a gén túlműködtetése a karotin termelés fokozódásához, csendesítése pedig apoptotikus folyamatokhoz vezetett, ami arra utal, hogy e gén terméke is fontos szerepet játszik a gomba életfolyamataiban. A *hmgR1* gén kifejeződése volt a leggyengébb mind aerob, mind anaerob körülmények között, funkcionalitását eddig nem sikerült igazolni.