

36. OTDK Biológia Szekció

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS
INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**Egy növényekben azonosított, ritkán előforduló
peroxiszóma lokalizációs szignál működésének
igazolása *Aspergillus nidulans*-ban**

Témavezető:

Dr. Hamari Zsuzsanna

Egyetemi Docens

Készítő:

Alzheimer Kevin

Harmadéves BSc hallgató

Szeged

2022

Tartalomjegyzék:

1. Bevezető	4
1.1. A peroxiszómák szerepe	5
1.2. Fehérjék transzportja a peroxiszómákba	5
1.2.1. PTS-1 transzlokációs gépezet	7
1.2.2. PTS-2 transzlokációs gépezet	8
1.3. Ismeretlen PTS-ek és alternatív megoldások.....	8
1.4. Gombák peroxiszómális fehérjei.....	11
2. Célkitűzés.....	14
3. Anyag és módszertan	15
3.1. Felhasznált törzsek.....	15
3.2. Tápközegek.....	15
3.2.1 Luria-Bertani (LB) tápközeg	15
3.2.2. <i>A. nidulans</i> minimál tápközeg.....	15
3.2.3. <i>A. nidulans</i> komplett tápközeg.....	15
3.2.4. <i>A. nidulans</i> szacharózos minimál táptalaj.....	15
3.2.4. Sóoldat ⁷⁹	15
3.2.5. Nyomelem-törzsoldat ⁷⁹	15
3.2.6. Komplex vitamin keverék	16
3.3. Felhasznált anyagok.....	16
3.3.1. GET oldat.....	16
3.3.2. Alkalikus SDS	16
3.3.3. High salt	16
3.3.4. Agaróz gélelektroforézishez felhasznált anyagok	16
3.3.5. TAE puffer (50x)	16
3.4. Módszerek	16
3.4.1. Polimeráz láncreakciók és a transzformáló vektorok elkészítéséhez felhasznált primerek	16
3.4.2. PCR termékek tisztítása.....	17
3.4.3. Tisztított PCR termékek emésztése, izolálása és vektorba ligálása	17
3.4.4. Agaróz gélelektroforézis	17
3.4.5. <i>E. coli</i> elektrokompens sejt készítése elektroporációval történő transzformációhoz	18
3.4.6. <i>E. coli</i> transzformáció elektroporációval	18
3.4.7. Plazmid DNS kivonás <i>E. coli</i> transzformáns törzsekből.....	18
3.4.8. <i>A. nidulans</i> transzformálás ⁸⁰	19
3.4.9. Fluoreszcens mikroszkópozás.....	19
4. Eredmények.....	21
4.1. Az AN5316 és AN1402 fehérjék <i>in silico</i> domén elemzése	21
4.2. A Gfp SYM és SRL motívummal történő jelölése, fúziója AN5316-tal és AN1402-vel majd klónozása pAN-HZS-vektorba.....	21
4.3. A keletkezett vektorok transzformálása <i>A. nidulans</i>-ba.....	23
4.4. Epiteppal jelölt GFP fúziós fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata	24
5. Eredmény összefoglalás	26

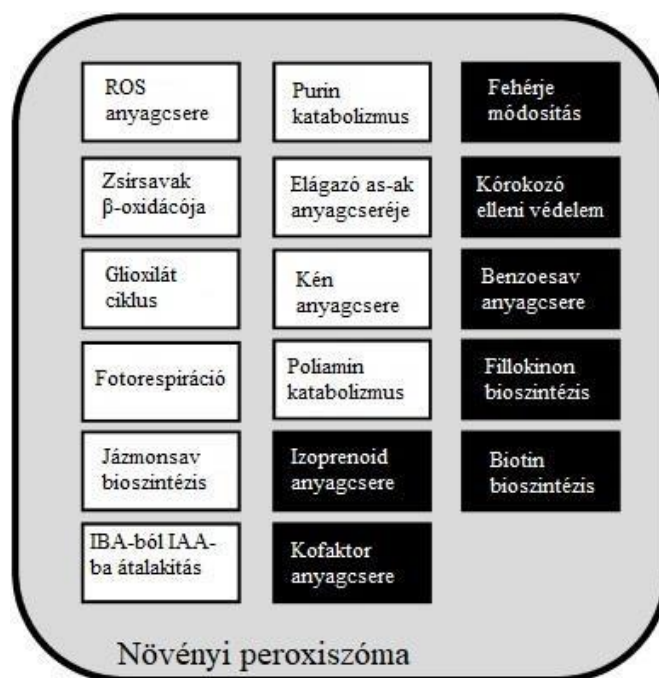
6. Irodalomjegyzék	27
7. Nyilatkozat	33
8. Köszönetnyilvánítás	36

1. BEVEZETŐ

A peroxiszómák a legtöbb eukarióta élőlényben megtalálható organellumok. Méretük szerint nagyjából 0,2-1,0 μm -es átmérőjűek, melyek fontos fiziológiai feladatokat látnak el a sejtekben (részleteket lásd az 1.1. alfejezetben)^{1,2}. A peroxiszómák figyelemre méltóan dinamikus sejtalkotók, mivel aktivitásuk, morfológiájuk és számuk a szerv, szövet és a tápláltsági állapottól függően képesek megváltozni³. A kezdetben mikrotesteknek nevezett peroxiszómákat Rhodin⁴ jegyezte fel a doktori disszertációjának egyik részében, ahol az egérvese proximális tubulus sejtjeinek morfológiájáról írt. A Rhodin által körülírt mikrotest egy újabb típusú sejtorganellumként történő azonosítása csak évekkel később történt meg, amikor Christian de Duve és a csapata sikeresen izoláltak és biokémiaileg jellemeztek patkánymájából tisztított „mikrotesteket”⁵. Miután de Duve és csapata több olyan enzimet fedeztek fel a „mikrotestekben”, melyek hidrogén-peroxid képződést generáltak, vagy azt semlegesítették, avizsgált sejtorganellumot peroxiszómának nevezték el. Azóta több organizmusból is izoláltak peroxiszómákat és nyilvánvalóvá vált, hogy fajonként jelentősen eltérhetnek a peroxiszómák specifikus metabolikus tulajdonságai, de még egy fajból, de eltérő szövetből származó, vagy egy fajból, de különböző környezeti körülmények között tartott sejtek esetén is eltérhet a peroxiszómákban jelen lévő enzimek összetétele funkció és mennyiség alapján. Némely organizmusban annyira eltér a peroxiszóma aktivitása az általánostól, hogy eleinte különálló organellumoknak gondolták és azóta is más néven nevezik. Ilyen például a *Trypanosoma* fajok glikoszómái, melyekben főleg különböző glikolitikus reakciók zajlanak, vagy néhány növény glioxiszómái, melyekben elsősorban a glioxilát-ciklus zajlik. A fonalas Ascomycota gombákban létrejött egy speciális módosult peroxiszóma, az úgynevezett Woronin test⁶, amely a sejtintegritásban játszik szerepet azáltal, hogy sebzés esetén lezárja a szeptális pórust^{7,8}. Különleges módon a szentjános bogarak luciferáz enzime SKL peroxiszóma lokalizációs szignált hordoz, és a peroxiszómában működik. Számos gombafaj képes másodlagos metabolitok előállítására (pl. a penicillin, melyet például többek között a *Penicillium* fajok termelnek), melyek egyes lépései a peroxiszómákban zajlanak⁹. Ennek a nagy metabolikusdiverzitásnak ellenére, minden peroxiszómában jelen van egy közel azonos fehérjekészlet, amely a peroxiszómák biogenezisében és fenntartásában játszik szerepet. Ezenkívül minden peroxiszómában közös az a szignál készlet, amelyet a lokalizációt segítő peroxiszóma fehérjék felismernek és előidézik a lokalizációs szignált hordozó (peroxiszóma targeting szignál, azaz PTS) fehérjék peroxiszómába jutását. A közös vonások jelenléte alátámasztja, hogy az összes peroxiszóma közös evolúciós eredetre vezethető vissza¹⁰⁻

1.1. A peroxiszómák szerepe

Az állatokban, növényekben és gombákban is jelen lévő peroxiszómák általános feladata a zsírsavak és alkoholok oxidációja és a hidrogén-peroxid metabolizmusa^{16–18}. A növényi peroxiszómák alapvető fontosságúak a főbb metabolikus funkciókban, mint például a lipid anyagcserében, a fotorespiráció egyes folyamataiban (glikolsav átalakítása glicerinsavvá)¹⁹, a hormon bioszintézisben és a reaktív oxigéngyökök metabolizmusában. Kulcsszerepet játszanak a növények abiotikus és biotikus stresszhatásokra adott válaszaiban^{20,21}. Proteom-elemzéseknek köszönhetően az elmúlt néhány évben jelentős előrelépés történt a növényi peroxiszómák további funkcióinak azonosításában²². Bár első sorban katabolikus sejtkompartmentnek tekintették, a növényi peroxiszómákról kiderült, hogy alapvető anabolikus folyamatokban is részt vesznek, például a biotin bioszintézisében^{23,24}, a fillokinon (K₁ vitamin) bioszintézisben^{25–28}, és benzoészav-származékok keletkezésében (1. ábra)^{29–35}.



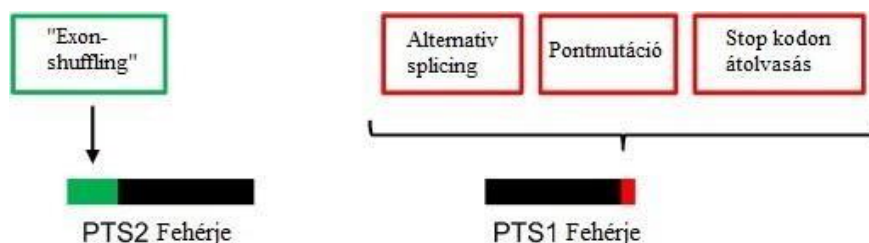
1. ábra: A növényi peroxiszómák élettani funkciói²²

Az itt jelen lévő növényi peroxiszóma funkciók közül a fehér dobozokban a klasszikus funkciók vannak megjelenítve, a fekete dobozokban pedig a nemrég felfedezett metabolikus (katabolikus és anabolikus) és nem-metabolikus funkciók vannak felsorolva. IAA: indol-3-ecetsav; IBA: indol-3-ajsav; ROS: reaktív oxigéngyökök

1.2. Fehérjék transzportja a peroxiszómákba

A peroxiszómák minden fehérjéje a sejtmagi genomban kódolt. A fehérjéket kódoló gének hordozzák a fehérjék peroxiszómális lokalizációs szignál (PTS) motívumának a DNS kódját is. Így a fehérjék, melyek a peroxiszómális fehérjéket kódoló gének transzkriptumairól képződnek a

riboszómákon (a peroxiszóma mátrix proteinek a citoszol szabad riboszómáin képződnek, míg a peroxiszóma membránlokalizált fehérjék az endoplazmatikus retikulum riboszómáin képződnek), elnyerik végső konformációjukat, összeépülnek ko-faktoraikkal (ha van), és multimereket formálnak (ha ez kell az aktív fehérje kialakulásához), majd a PTS birtokában eljutnak és bekerülnek a peroxiszómákba. A legtöbb mátrix fehérjének a C-terminális végén peroxiszóma targeting signal-1 (PTS-1) található, mely egy tripeptid (például az SRL)^{12,36–41}. Néhány mátrix protein nem a C-terminálison, hanem az N-terminális végükön hordozzák a lokalizációs szignált (PTS-2), mely egy konzervált nonapeptid (RLx5HL)^{42–46}. Általánosságban mind a PTS-1, mind pedig a PTS-2 útvonalak aktívan működnek az eukarióta sejtekben és fennakadás nélkül transzlokálják a fehérjéket a peroxiszómális mátrixba. A többi sejtorganelumhoz (mitokondrium, endoplazmatikus retikulum, kloroplaszt) hasonlóan szokatlan az a jelenség, hogy egyidejűleg két fő import útvonal működjön az oldható fehérjék szállítására. Jelenleg még nem ismert tény, hogy miért alakult ki és maradt fenn egyidejűleg működő két különböző befele irányuló útvonal a peroxiszómális mátrix fehérjék transzlokációjára. Azt sem érti még a tudomány, hogy az egyik útvonal (PTS-1) miért jobb a másiknál mind hatékonyságában, specifikusságában vagy szubsztrát változatosságában. Az összes eukariótában a PTS-1 szignál sokkal gyakoribb előfordulása, mint a PTS-2. Ez arra utal, hogy a PTS-1 gépezet hatékonyabban teljesít, mint a PTS-2 gépezet. Mivel az egyszerűbb PTS-1 szignál több módon és könnyebben tud létrejönni, mint a PTS-2 (2. ábra), valószínűleg ez nagyban hozzájárult ahhoz, hogy gyakoribb a PTS-1 szignált hordozó fehérjék előfordulása²².



2. ábra: A különböző evolúciós mechanizmusok az új (nem-paralóg) peroxiszómális mátrix fehérjék létrejöttéhez²².

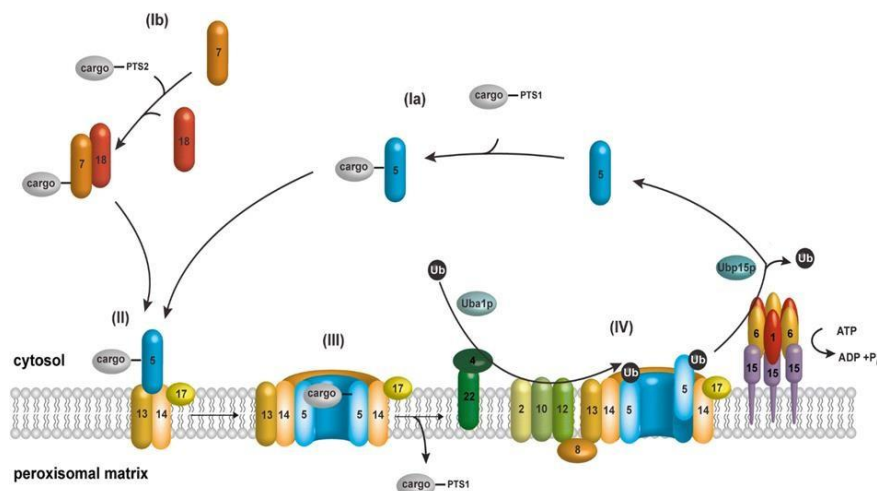
A hosszabb N-terminális PTS-2 feltehetően "exon-shuffling" útján keletkezik. Ezzel szemben viszont, a C-terminális tripeptidből álló PTS-1 három különböző mechanizmus révén is keletkezhet.

A PTS-1 szignál és PTS-1 transzlokációs gépezet hatékonyságát a PTS-2-ével szemben az is alátámasztja, hogy több filogenetikus egymáshoz nem kapcsolódó faj pl.: vörös alga, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* csakis a PTS-1 útvonalat használja. Úgy gondolják, hogy ezekben a fajokban

régebben még létezett a PTS-2 gépezet, de valamikor az evolúció során elvesztették a PTS-2 útvonalat, és most már csak a PTS-1 útvonalra hagyatkoznak (2. ábra)^{47–51}.

1.2.1. PTS-1 transzlokációs gépezet

A legtöbb peroxiszómális protein PTS-1 szignált hordoz és a PTS-1 útvonalon jut a mátrixba. A folyamat során a fehérjék transzlációja és érése után a C-terminálisukon lévő PTS-1 tripeptidet citoszolikus receptor fehérje (Pex5p) ismeri fel, és hozzácsatlakozik a PTS-1-et hordozó fehérjéhez, ezzel egy fehérje-receptor komplexet létrehozva^{52–55}. A fehérje-receptor komplex a peroxiszómális membránhoz vándorol, és ott hozzákötődik a membránba ágyazott dokkoló komplexhez, melyet a Pex13p, Pex14p és Pex17p fehérjék alkotnak. Ekkor a dokkoló komplex Pex14p fehérjéje a Pex5p receptorral egy átjárható pórust formál. A Pex5p receptor ubiquitinálódik az Uba1p ubiquitin konjugáló enzim által, a Pex5p receptorhoz kapcsolt fehérje bejut a mátrixba a póruson áthaladva, az ubiquitinált, fehérjecsomagjától megszabadult Pex5p pedig leválik a dokkoló komplexről, amely a pórus szétszerelődéséhez vezet. A leválást követően az ubiquitinált Pex5p receptorról az Ubp15p deubiquitináz enzim lehasítja az ubiquitint, és a deubiquitinálódott Pex5p receptor újra képes lesz PTS-1 szignált hordozó fehérje befogására (3. ábra)⁵⁶. Fontos megemlíteni, hogy a transzlokálódó fehérje a peroxiszóma mátrixba bekerülés után is megtartja a PTS-1 szignálját szemben más organelumokba történő transzlokációval (pl. mitokondrium), melyre az jellemző, hogy a lokalizációs szignál a transzlokáció során, vagy a transzlokációt követően lehasad a fehérjéről.⁵⁶



3. ábra: A PTS-1 és PTS-2 szignált hordozó fehérjék bejutása a peroxiszóma mátrixba⁵⁶.

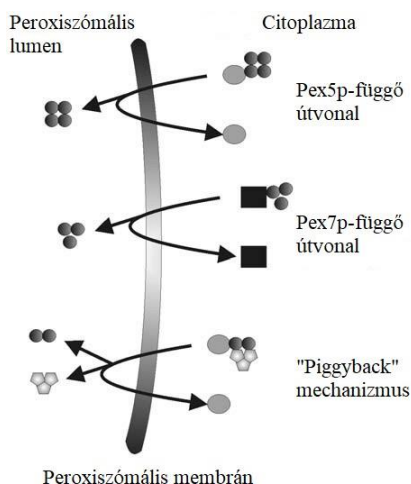
Ia: a PTS-1-et hordozó fehérjét a Pex5p ismeri fel; Ib: a PTS-2-t hordozó fehérjét a Pex7p ismeri fel; II: A PTS-1 transzlokációs gépezetben a Pex5p a dokkoló komplexhez kapcsolja a receptor-fehérje komplexet (PTS-2 esetében a Pex18p kapcsolódik a Pex14p-hez); III: Az átjárható pórus létrejön (csak a PTS-1 gépezet pórusa vanmutatva) és bekerül a mátrixba a fehérje; IV: A PTS-1 gépezet esetén a receptor ubiquitinációjával a pórus szétszerelődik

1.2.2. PTS-2 transzlokációs gépezet

Az N-terminálison hordozott PTS-2-vel bíró fehérjét a citoszolikus Pex7p receptor felismeri és kapcsolódik a PTS-2 hordozó fehérjével (3. ábra). Ezt követően, egy másik, ún. társ-receptor, a Pex18p (vagy a Pex21p) fehérje kapcsolódik a létrejött komplexhez (3. ábra). Ez a három fehérjéből álló komplex fog hozzákötődni azon membránba ágyazott dokkoló komplexhez, melyet a PTS-1 gépezet is használ (lásd. 1.2.1. alfejezet) (3. ábra). A különbség az, hogy a társ-receptor (Pex18preceptor) létesít kapcsolatot a Pex14p dokkoló komplex alegységgel hasonló módon, ahogy a PTS-1 gépezetben a Pex5p receptor kapcsolódik a Pex14p-hez. A Pex18p receptor kapcsolata a Pex14p dokkoló komplex alegységgel pórus formáláshoz vezet, melyen át a PTS-2 szignált hordozó fehérje bejut a peroxiszóma mátrixba⁵⁶. Azt még nem tárták fel, hogy milyen mechanizmussal válik le a PTS-2fehérje a Pex7p receptorról és hogyan regenerálódik a Pex7p és Pex18p receptor a következő PTS-2 fehérje kapcsolat létesítéséhez.

1.3. Ismeretlen PTS-ek és alternatív megoldások

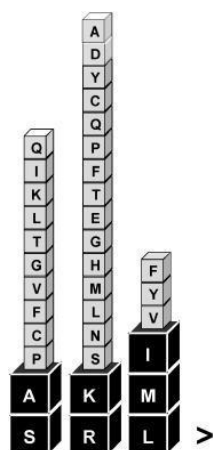
A peroxiszómában található fehérjék közül sokkal több fordul elő, mint amennyin a jelenleg ismert peroxiszómális targeting szignálok valamelyikét azonosítani tudjuk. Ezek a fehérjék nagy eséllyel hordozhatnak olyan lokalizációs szignál motívumot, amelyet még nem azonosítottak. Az is lehetséges, ahogyan arra példa is van a szakirodalomban⁵⁷, hogy a kérdéses peroxiszómális fehérje olyan felszíni aminosav oldalláncokkal rendelkezik, amely révén fizikailag kapcsolódni tud egy olyan fehérjével, amelynek viszont van PTS-ja. Mesterséges heterodimerek létrehozásán keresztül igazolták, hogy a heterodimer (vagy akár heterotrimer vagy heterotetramer) molekulákon elég ha az egyik fehérjehordozza a PTS-t (ez lehet PTS-1 vagy PTS-2 is)⁵⁸. A multimer minden tagja kimutatható volt a peroxiszómában⁵⁸. Ezt a peroxiszómális transzlokációs mechanizmust a szakirodalom “piggybacking”-nek nevezi. Mivel a “piggybacking” mechanizmus vagy a PTS-1 vagy a PTS-2 transzlokációs gépezettől függ, a gépezet valamilyen funkcionális komponensének hiányában (pl Pex5p, Pex7p, Pex18p, Pex14p stb.) a “piggybacking” által bejutó fehérje lokalizációja is sérül (4. ábra)⁵⁹.



4. ábra: PTS nélküli fehérjék bejutása a peroxiszómába például a PTS-1 gépezetet használva “piggybacking” révén⁵⁹.

Sötét szürke körök: PTS-el rendelkező fehérje, Világos szürke kör: Pex5p, Fekete négyzet: Pex7p, Világos ötszögek: PTS nélküli fehérje

A PTS-1 szignálokat hagyományosan kanonikus és nem-kanonikus csoportokba sorolhatjuk be. A kanonikus csoportban lévő tripeptideknek nevezzük azokat, melyek a leggyakoribbak az előfordulásukat tekintve, és általában önmagukban is elégségesek a transzlokációhoz (nem-kanonikus, a receptorral gyenge kapcsolatot kialakító motívumok esetén a fehérje bizonyos aminosav oldalláncainak segítenie kell a receptorkötést) és az őket alkotó aminosavak hely specifikusak. Az [SA][RK] [LMI] képlettel írhatók le a kanonikus motívumok, ahol az 1-es, a 2-es és a 3-as pozícióban előforduló aminosavak minden kombinációban erős és önálló PTS-1 szignálok. Az ilyen tripeptidekbőlálló PTS-1-ek nagyobb affinitással kapcsolódnak a Pex5p-hez is, mint a nem-kanonikus csoportba sorolt társaik^{36,38–40,54,60–65}. A nem-kanonikus PTS-1 tripeptidek egy nem-kanonikus aminosavat hordoznak az egyik pozíciójukban⁶⁶. Ez lehet bármelyik az oda illő lehetséges aminosavak közül, de csakis akkor lehet jelen, hogyha a kettő másik aminosav a kanonikus csoportot jellemző aminosav, pl.: QRL, SLM (a nem-kanonikus aminosav alá van húzva). Az eddig elvégzett összes kísérletes eredmény alátámasztja, hogy a PTS-1-ben egy nem-kanonikus aminosav kettő kanonikussal kell, hogy tripeptidet alkosson. Az 5. ábra jól szemlélteti ezt a szabályt⁶⁶.



5. ábra: A PTS-1 motívum pozíció specifikus variabilitása²².

A fekete kockákban a lehetséges kanonikus aminosavak, a szürke kockákban pedig a nem-kanonikus aminosavak olvashatók. Az eddigi tapasztalatokból felállított szabály szerint, egy működőképes PTS-1 tripeptidhez szükséges kettő kanonikus és egy nem-kanonikus aminosav bármilyen sorrendben. A (>) -jel a C-terminális végét jelzi a PTS-1 fehérjéknek.

Köszönhetően az alábbiakban bemutatásra kerülő kutatásoknak a jelenleg ismert szignálok tára kibővült (5. ábra), és így a PTS szignálok felismerése és *in silico* predikciója tökéletesedett. Ennek ellenére a PTS szignálok kutatása továbbra is nagy jelentőséggel bír. Bárki gondolhatná, hogy az “omikák” korszakában egyszerű az izolált peroxiszóma organellumokban található fehérjék proteomjának meghatározása, és a peroxiszómában talált enzimek listába szedése. Mivel a peroxiszómákban bizonyos enzimikus folyamatok nagy erővel működnek, ezen reakciókba résztvevő fehérjék dominálnak a kisebb intenzitással folyó reakciókat végző fehérjékkel szemben. Az alul-reprezentált fehérjék mennyisége gyakran olyan kicsi, hogy nehéz fehérje gélen észlelni jelenlétüket, nem beszélve arról, hogy az azonosításukhoz szükséges egy minimális mennyiség, mely nehezen előállítható. Még külön kielezi a helyzetet az is, hogy a peroxiszóma izolálás előtt egy adott vizsgálati körülmény mellett lehetséges, hogy számos metabolikus folyamatban, detoxifikálásban, abiotikus stresszválaszban vagy egyedfejlődéshez kapcsolt folyamatban érintett peroxiszómális fehérje egyáltalán nem fejeződik ki, így nincsenek prezentálva a peroxiszómákban sem. Ezért elmondhatjuk, hogy még a jelenlegi ismereteink is csak a töredékét adják annak a biológiai folyamat repertoárnak, mely a peroxiszómákhoz kapcsolhatók. Éppen ezért, továbbra is a leghatékonyabb módszer a peroxiszóma biológiai reakció-repertoárjának felderítésére a fehérjék PTS szignáljának *in silico* azonosítása, melyet aztán kísérleti úton bizonyítani lehet. Az 5. ábrán demonstrált szabályszerűség növényi peroxiszómák proteom-analízisének és növényi adatbankok *in silico* elemzését követő kísérletes munkának köszönhető. Ezt a két heroikus kutatást foglaljuk össze az alábbiakban.

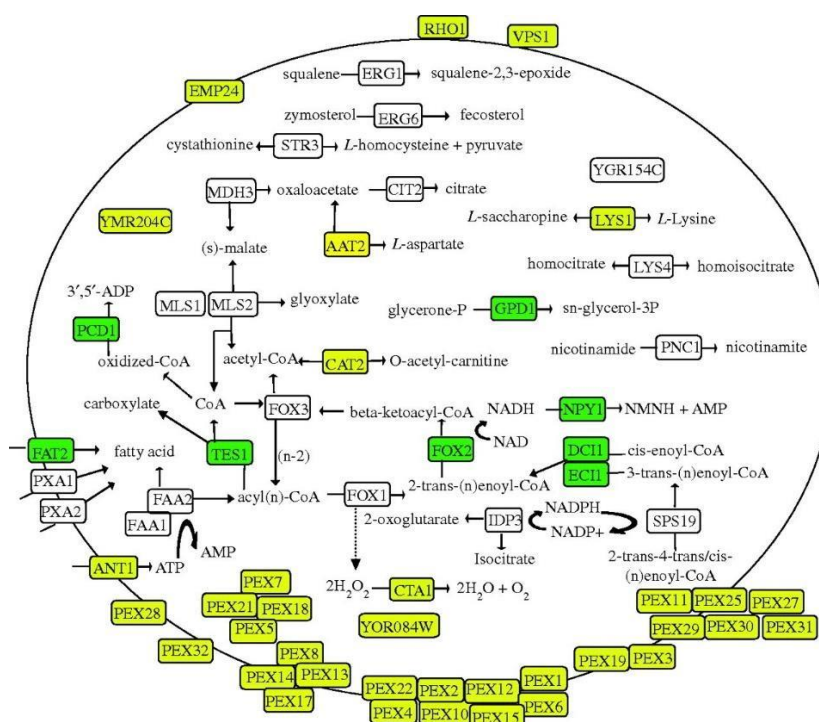
Egy 2011-ben publikált, (növényen végzett) kísérletes vizsgálat során az *Arabidopsis thaliana* izolált peroxiszómáin végeztek el proteom elemzést. Mivel a modellszervezet teljes genomja ismert volt, az azonosított fehérjéket kódoló géneket is visszafejtették⁶⁷. A peroxiszómából izolált mintában 302 fehérjét azonosítottak, melyek közül 65 fehérjéről vagy annak más növényben vizsgált ortológjáról volt csak kísérletes igazolás a szakirodalomban arra vonatkozóan, hogy a fehérje peroxiszómális eredetű. Az azonosított fehérjék C-terminális szekvenciáinak összehasonlító elemzése után az eddig ismert PTS-1 tripeptideken kívül további PTS-1 tripeptideket valószínűsítettek. Ezt követően a különböző, eddig nem vizsgált motívumokat hordozó fehérjék egy-egy reprezentánsán, illetve szignált egyáltalán nem hordozó 16 fehérjén fluoreszcens protein jelölést követően vizsgálták a fehérjék lokalizációját⁶⁷. A tanulmány nagyban hozzájárult az 5. ábrában demonstrált szabályszerűség leírásához. Ezen kívül azonosítottak 3 olyan peroxiszómális fehérjét, amely semmilyen felismerhető lokalizációs szignált nem hordoz⁶⁷.

Reumann és mtsai. munkájával⁶⁷ egyidőben egy másik kutatás is zajlott, melyben az addig ismert mintegy 60 *A. thaliana* PTS-1 fehérje ortológjait összegyűjtötték az elérhető adatbázisokból³⁹. Mintegy 2500 fehérje gyűlt össze az akkor rendelkezésre álló 260 növényfaj EST és prediktált fehérje adatbázisaiból³⁹. Azt feltételezve, hogy a vélhető ortológok szintén peroxiszómális fehérjék, az ortológok C-terminális végeinek összehasonlító elemzésével az addig ismert PTS-1 tripeptid motívumok számát tovább tudták bővíteni 23-al, melyekből 18 hitelességét *in vivo* intracelluláris lokalizáció vizsgálattal alá is támasztották (enhanced-YFP fúziós proteinek kifejeztetését követő fluoreszcens mikroszkópiával)³⁹. Az SCL, SYM, IKL, KRL és AHL tripeptideket növényi peroxiszómális lokalizációs szignálokként írták le. Ez a munka szintén nagyban hozzájárult az 5. ábrán demonstrált PTS-1 tripeptid szabályszerűségének felderítéséhez.

1.4. Gombák peroxiszómális fehérjéi

A gombák peroxiszómáinak kutatásában nagy segítséget jelentett a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba modellszervezeten végzett kutatás, melyet a *S. cerevisiae*-n alkalmazható széles molekuláris eszköztár és genomjának ismerete tett lehetővé. Átfogó tanulmányok, mint például az olajsavban történő növekedés során jellemző transzkriptom analízise⁶⁸, a genomban kódolt fehérjék 75%-át lefedő fehérjének a Gfp-fúziós konstrukcióját kifejező törzsgyűjtemény fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata⁶⁹, vagy nagy tisztaságú peroxiszómális frakciók proteom analízise^{70,71} nagyban hozzájárult a gomba peroxiszómák funkciójának feltárásához. Filogenetikai vizsgálatok alapján az eddig ismert élesztő peroxiszómális fehérjék nagy része eukarióta, vagy alfa- proteobaktérium eredetű, és vannak olyanok, melyeknek eredetét még nem tárták fel (6. ábra)¹¹. A *S. cerevisiae* peroxiszómáiban található enzimek elsősorban az aminosav anyagcserében és a zsírsavak

oxidációjában vesznek részt, valamint az ezen folyamatok során keletkezett reaktív oxigéngyökök neutralizálásában (6. ábra). Más élesztőfajok esetén, melyek számos szokatlan szén és szerves nitrogénforrás hasznosítására specializálódtak, a peroxiszómákban a *S. cerevisiae*-től teljesen eltérő metabolikus folyamatok figyelhetők meg⁷². Például a metilotróf élesztőfajok (pl.: *Candida boidinii*, *H. polymorpha*, *P. pastoris*) peroxiszóma fejlődést indukálnak ha egyedüli szénforrásként metanolon növekednek. Ezekben a peroxiszómákban a metanol anyagcserében közreműködő enzimek dominálnak, például az alkohol-oxidáz és a dihidroxiaceton-szintáz, amelyek a sejt teljes fehérjetartalmának akár 70%-át is kitehetik. A fonalas gombákban a peroxiszóma számos bioszintetikus szerepet is betölthetnek. A penicillin bioszintézisének utolsó lépései például a peroxiszómában történnek a *P. chrysogenum*-ban⁷². Ezen kívül a peroxiszóma a biotin szintézisben, poliamin metabolizmusban és toxinok termelésében is részt vesznek^{24,73–78}.



6. ábra: A *S. cerevisiae* peroxiszómális proteomja és anyagcseréje a proteomikai adatok alapján¹¹.

A körvonal a peroxiszóma membránját jelöli. A négyzetekben a fehérjék nevei szerepelnek. A nyilak és a reakciókomponensek a metabolikus lépéseket jelölik. A színek az egyes fehérjék evolúciós eredetét jelzik. Zöld: alfa-proteobaktérium eredetű; sárga: eukarióta eredetű; fehér: még nem meghatározott eredetű.

A *S. cerevisiae* modellszervezetben számos peroxiszómához kötött biológiai folyamatot azonosítottak, a növényeken alkalmazható vizsgálatokhoz képest sokkal nagyobb áteresztőképességű módszereket alkalmazva⁶⁹. Azonban a gombák sokfélesége és a fenti példák által bemutatott metabolikus diverzitás miatt, a teljes lehetséges gomba peroxiszóma fehérje repertoár megfejtéséhez a megoldást egy tökéletessé fejlesztett PTS lista létrehozása és az *in silico* predikció jelenthet. A növényi PTS kutatások során felbukkant a SYM C-terminális triplet, melyet növény-specifikusnak gondolnak³⁹. A nagy áteresztőképességű *S. cerevisiae* kutatások során nem találtak SYM motívummal rendelkező fehérjét, de azért a gombák metabolikus diverzitása okán nem kizárt, hogy akár gombákban is létezhet ez a szignál. Laborunkban az *Aspergillus nidulans* fonalas gomba modellszervezet tanulmányozásával foglalkozunk. A *S. cerevisiae*-hez hasonlóan az *A. nidulans* is kiváló modellszervezet, melynek a genomja haploid és könnyen manipulálható, szexuális és paraszexuális életciklussal is rendelkezik, és számos auxotróf mutáns áll rendelkezésre. Az *in silico* elemzéseink alapján két fehérjét is kódol, melynek a C-terminálisán SYM motívum található. Ennek tükrében felvetődik az a kérdés, hogy vajon a SYM motívum PTS szignálként viselkedik-e gombákban. Munkám ezen kérdés megválaszolására fókuszál.

2. CÉLKITŰZÉS

Célul tűztük ki, hogy a növényekben azonosított ritkán előforduló SYM PTS-1 szignál működését megvizsgáljuk *A. nidulans* fonalas gomba modellszervezetben SYM epitóppal jelölt Gfp fehérje lokalizációjának vizsgálatával, valamint az *A. nidulans*-ban előforduló C-terminális SYM motívumot hordozó AN1402 és AN5316 fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálatával.

A feladat elvégzését SYM epitóppal ellátott Gfp gén integratív expressziós vektorba történő klónozásával és *A. nidulans*-ba transzformálásával terveztük végrehajtani.

A C-terminális SYM motívumot hordozó *A. nidulans* fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálatához pedig a szóban forgó fehérjék N-terminális Gfp fúziós konstrukciójának létrehozását terveztük, majd azok expressziós integratív vektorba történő klónozását követően a vektorok *A. nidulans*-ba transzformálását és a transzformánsok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatát terveztük.

3. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

3.1. Felhasznált törzsek

E. coli JM109 genotípusa: *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ($r_K^- m_K^+$), *e14^-* (*mcrA^-*), *supE44*, *relA1*, $\Delta(lac-proAB)/F'[traD36, proAB^+ lacI^q, lacZ \Delta M15]$

A. nidulans HZS. 572 genotípusa: *pantoB100* *biA1* *pabaA1* *veA1* (*riboB2*) és *pDsRed-SKL-argB* plazmid 1 kópiában integrálódva

3.2. Tápközegek

3.2.1 Luria-Bertani (LB) tápközeg

1% (m/V) NaCl; 1% (m/V) tripton; 0,5% (m/V) élesztő kivonat; 2,5% (m/V) agar szilárd tápközeg esetén; 50 µg/ml ampicillin, transzformáns *E. coli* telepek szelektálása esetén

3.2.2. *A. nidulans* minimál tápközeg

2 (V/V%) sóoldat; 1% (m/V) glükóz; 2,5 % (m/V) agar; 10 mM NaNO₃ nitrogénforrással és a szükséges vitaminnal kiegészítve; (pH=6,8)

3.2.3. *A. nidulans* komplett tápközeg

2% (V/V) sóoldat; 1% (m/V) glükóz; 0,1% (m/V) élesztő kivonat; 0,2% (m/V) pepton; 0,15% (m/V) kazamínosavak (pH=6,8); 2,5% (m/V) agar szilárd tápközeg esetén; 1% (V/V) komplex vitamin keverék

3.2.4. *A. nidulans* szacharózos minimál táptalaj

2% (m/V) NaCl; 1% (m/V) glükóz; 34,2% (m/V) szacharóz; 10 mM NaNO₃; 2,5% (m/V) agar; top agar készítése esetén 1% (m/V)

3.2.4. Sóoldat⁷⁹

26% (m/V) KCl; 26% (m/V) MgSO₄×7H₂O; 76% (m/V) KH₂PO₄; 5% (V/V) nyomelem törzsoldat

3.2.5. Nyomelem-törzsoldat⁷⁹

40 mg/l Na-borát (Na₂B₄O₇×10H₂O); 400 mg/l CuSO₄×5H₂O; 714 mg/l FePO₄; 728 mg/l MnSO₄×H₂O; 800 mg/l Na₂MoO₄×2H₂O; 8 mg/l ZnSO₄×7H₂O

3.2.6. Komplex vitamin keverék

200 µg/ml pantoténsav; 200 µg/ml para-amino-benzoésav; 250 µg/ml riboflavin; 5 µg/ml piridoxin; 2 µg/ml biotin; 10 µg/ml tiamin

3.3. Felhasznált anyagok

3.3.1. GET oldat

25 mM TRIS (pH=7,5); 10 mM EDTA (pH=8); 0,9% glükóz; 1 mg/ml lizozim

3.3.2. Alkalikus SDS

2% SDS; 0,2 M NaOH

3.3.3. High salt

3 mM K-acetát; 11,5% jégcet; pH=4,6

3.3.4. Agaróz gélelektroforézishez felhasznált anyagok

1×TAE puffer (tris-acetát-EDTA); 0,8% (m/V) agaróz; 5 µg/ml EtBr; 6×loading oldat (Thermo Scientific); GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific)

3.3.5. TAE puffer (50x)

40 mM Tris-HCl; 20 mM ecetsav; 1 mM EDTA; pH=7,5

3.4. Módszerek

3.4.1. Polimeráz láncreakciók és a transzformáló vektorok elkészítéséhez felhasznált oligonukleotid indítószekvenciák.

A polimeráz láncreakciók reakcióelegyét a Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS polimeráz felhasználásával állítottuk össze (Thermo Scientific) a mellékelt gyártói utasítások szerint 50 µl végtérfogatban, az alábbiak szerint: 1X Phusion HF puffer; 0,2-0,2 mM dNTP; 0,5 µM forward és reverz primerek; 50-250 ng DNS templát; 0,02 U/µL Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS Polimeráz

A PCR során alkalmazott reakciókörülmények a következők voltak: 98 °C, 30 s elődenaturáció; 98 °C, 10 s denaturáció; 58-72 °C, 30 s hibridizáció; 72 °C, mérettől függően 30 s-3 perc polimerizáció (30 s /1 kb szintézis sebességgel számolva); 72 °C, 1-6 perc utópolimerizáció

A pAN-HZS-22, pAN-HZS-23, pAN-HZS-29 és a pAN-HZS-30 transzformáló kazetták létrehozásához felhasznált primerek listáját az 1. táblázat összegzi.

1.táblázat: Jelen munka során alkalmazott indítószekvenciák

1pGpd int frw	5'-cagtatattcatcttcccatccaagaac-3'
22 gfp linker kim rev	5'-caagatcgactgtatcaataagcttgtagctcgccatgccgtg-3'
link kim AN1402F	5'-acaagcttattgatacagtcgatcttgatatgaccgcaatcgcgaccgcatc-3'
AN1402 down rev	5'-gtaactccgcagcaactagcaatcg-3'
link kim AN5316F	5'-acaagcttattgatacagtcgatcttgatatgtccagtcaggagccccaaaac-3'
AN5316 down rev	5'-cgacggtaggcgactgggtaatg-3'
5 gfp NcoI start frw	5'-tttttttccatggtagcaagggcgaggagc-3'
AN1402 NotI rev	5'-tttttttgcggccgctcacatagcttggttttagtcctg-3'
AN5316 BamHI rev	5'-tttttttggatccctacatgtacgacggcttggtgc-3'
GFP-SRL-BamHI R	5'-tttttttggatcccttaTAACCGCGActgtacagctcgccatgccg-3'
GFP-SYM BamHI R	5'-tttttttggatcccttaCATATAACTctgtacagctcgccatgccg-3'

A dőlt szekvencia részek a kiméra primerek 5' végére tervezett kiméra szekvenciákat, az aláhúzott szekvenciárészek a primerek 5' végére épített restriktációs endonukleáz felismerő motívumokat, míg a nagybetűvel írt részek a kanonikus SRL és a tesztelendő SYM motívumokat jelölik.

3.4.2. PCR termékek tisztítása

Az „E.Z.N.A. ® Cycle Pure Kit”-tel (Omega, Bio-tek), a mellékelt gyártói utasításokat követve a PCR termékeket megtisztítottuk a PCR reakcióelegy komponenseitől. A visszanyert termékek mennyiségét DNS gélelektroforézissel ellenőriztük.

3.4.3. Tisztított PCR termékek emésztése, izolálása és vektorba ligálása

A tisztított PCR-termékeket további PCR amplifikációk során, vagy emésztési reakciókban használtuk fel. Klónozáshoz az amplitonokat a gyártó utasításai alapján restriktációs endonukleázzal (Thermo Scientific) emésztettük, majd a megfelelő méretű DNS-fragmentumot a „GeneJET Gel Extraction Kit” (Thermo Scientific) segítségével gélből visszaizoláltuk. T4 ligáz (Fermentas) felhasználásával a tisztított termékeket a szintén restriktációs endonukleázzal emésztett, gélből visszaizolált pAN-HZS-1 vektorba építettük.

3.4.4. Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékek méretét és mennyiségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük le. A reakcióelegyekből 1 µl-t 0,8% (m/V)-os agaróz gélen futtattunk meg 1×TAE pufferben, 100 V feszültségen, Bio-Rad horizontális gélelektroforézis készülékkel. A DNS-t a gél 5 µg/ml etidium-

bromid tartalma és a DNS-be történő interkalálódása okán UV fény alatt vizualizáltuk. A méretek meghatározhatóságához „GeneRuler 1 Kb DNA ladder” DNS molekulásúly markert is futtattunk a gélen.

3.4.5. *E. coli* elektrokompetens sejt készítése elektroporációval történő transzformációhoz

A vektorkonstrukciók felszaporításához JM109 *E. coli* elektrokompetens sejteket készítettünk. Ampicillinnel kiegészített LB táptalajon egyedi telepeket izoláltunk, majd egy kolóniát 2 ml LB tápoldatba oltottunk, és 37 °C-on, egy éjszakán át, 180 rpm-mel rázattuk. Másnap a tenyészetből 1 ml-t 100 ml LB tápoldatba oltottunk, amit 37 °C-on addig rázattunk, míg a tenyészet optikai denzitása (OD) 600 nm-en elérte a 0,5-0,9 közötti értéket. A sejteket 4 °C-on 5000 rpm, 10 perc centrifugálással összegyűjtöttük, majd 3-szor 20 ml jéghideg steril desztillált vízzel, és 10 ml 10% jéghideg glicerol oldattal mostuk. A sejteket végül 10% hideg glicerol oldatba szuszpendáltuk, majd 80-80 µl-eket 1,5 ml mikrocentrifuga csövekbe adagoltunk. A transzformálásra kész sejteket felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.4.6. *E. coli* transzformáció elektroporációval

A 3.4.5. pontban leírt módon előállított elektrokompetens sejteket pár perc alatt jégen kiolvasztottuk, majd összekevertük 7,5 µl ligálási reakcióeleggyel. Az elegyet 1 mm részméretű előhűtött elektroporátor küvetába (Cell Project) pipettáztuk, és BioRad elektroporátor készülék Eco1 programját alkalmazva elektrosokkoltuk. Ezt követően a sejtekre azonnal 800 µl LB tápoldatot mértünk. A sejteket 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk, majd 100 µl mintát ampicillinnel kiegészített LB táptalajra szélesztettük. A visszamaradó oldatból a sejteket 5000 rpm 5 perces centrifugálással összegyűjtöttük és kiszélesztettük. A csészéket 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk.

3.4.7. Plazmid DNS kivonás *E. coli* transzformáns törzsekből

Az ampicillines LB táptalajon egyedi telepeket képző *E. coli* transzformánsokat 2 ml ampicillinnel kiegészített LB tápoldatba oltottuk. Egy éjszakán át tartó inkubációt követően (37 °C, 180 rpm rázatás) a sejteket mikrocentrifuga csőbe öntöttük, majd 5000 rpm-el 5 perc centrifugálással összegyűjtöttük. A sejteket 100 µl lizozimes GET oldatba szuszpendáltuk. A homogén mintákhoz 200 µl alkalikus SDS oldatot mértünk, hogy feltárjuk a sejteket, majd óvatos billegtetés után 150 µl „High Salt” oldattal kicsapódott a genomi DNS-t. A mintákat 25 percig jégen inkubáltuk, majd a képződött fehér csapadékot 13000 rpm, 10 perc centrifugálással ülepítettük. A felülúszókat megegyező mennyiségű kloroform-izoamilalkohol (24:1) oldattal vortexeltük és 10 perc centrifugálást követően (13000 rpm) a felső, vizes fázist pipettával összegyűjtöttük, és a plazmid DNS tartalmukat megegyező térfogatú izopropanol hozzáadásával kicsaptuk. Vortexelést követően az elegyet 1-2 órán át -20 °C-on

inkubáltuk, majd a DNS-t centrifugálással ülepítettük (10 perc, 13000 rpm). A pelletet 500 µl 70%-os etanollal mostuk, majd szobahőmérsékleten beszárítottuk. A plazmid DNS-t 0,05 mg/ml RNáz oldatban feloldottuk, és restrikciós endonukleázzal emésztettük másfél órán át. A megfelelő klónokat agaróz gélelektroforézis segítségével azonosítottuk. Nagyobb mennyiségű plazmid DNS kivonáshoz a kiválasztott transzformánsok 2 ml ampicillines LB-ben nevelt tenyészetéről 100 ml ampicillines LB tápoldatba oltottunk és 37 °C-on történő 14 órás ráztatás után a tenyészetből „Midi Plus Ultrapure Plasmid Extraction System” Kit-tel kivontuk a plazmid DNS-t a gyártó utasításai alapján (Viogene). A preparátumokból 5-10 µg mennyiségű plazmid DNS-t használtunk *A. nidulans* transzformálására.

3.4.8. *A. nidulans* transzformálás⁸⁰

Az *A. nidulans* transzformálásához celofánnal fedett komplett táptalaj felszínén 14-16 óra alatt különálló telepeket neveltünk 37 °C-on^{81,82}. A celofánokat hármásával, fejjel lefelé steril Petri-csészékbe helyeztük, és 0,7 M KCl oldatban oldott, 7,5 mg/ml Glucanex enzimkeverékben (Novozym) inkubáltuk a protoplasztok megjelenéséig. A celofánok felszínéről a 0,7 M-os KCl oldattal lemostuk a sejtfal nélküli sejteket, majd a micéliális szennyeződésektől 75-100 µm rácsszerkezetű nylon filteren való szűréssel szabadultunk meg. A protoplasztokat üveg centrifuga csőben ülepítettük (4000 rpm, 25 perc, 14 °C), majd 10 ml KCl oldattal történő átmosás után 1 ml 0,7 M KCl-ban felfuszpendáltuk. A protoplaszt koncentrációt Bürker-kamra segítségével megállapítottuk és 5×10^6 sejtet 2500 rpm-en 6 perc alatt ülepítettünk és transzformáltunk. A transzformáláshoz az ülepített protoplasztokat 200 µl TN1 oldatban szuszpendáltuk fel, majd 55 µl TN2 oldatot és 5-10 µg DNS-t mértünk hozzá. A mintákat 30 percig jégen hagytuk, majd 1 ml TN2 oldattal elegyítettük. Szobahőmérsékleten 5 perc inkubálást követően 10 ml 0,7 M KCl oldattal mostuk a transzformánsokat és a protoplasztokat centrifugálással ülepítettük (4000 rpm, 25 perc, 14 °C). A pelletet 1 ml KCl oldatban szuszpendáltuk fel, majd 50 ml 40 °C-os (vitaminokkal a céloknak megfelelően kiegészített) szacharóz minimál táptalajon (1% agarral) elkeverve 10 db (vitaminokkal a céloknak megfelelően kiegészített) szacharóz minimál táptalaj felszínére oszlattuk. A szelekciós markergént (*pantoB*⁺) hordozó vektorkonstrukciók sikeres beépülése esetén 3 nap elteltével (37 °C) transzformáns telepeket gyűjtöttünk.

3.4.9. Fluoreszcens mikroszkópozás

A Gfp-vel fúzionáltatott SYM, SRL, AN1402 és AN5316 fehérjék intracelluláris lokalizációját fedőlemezen csíráztatott micéliumok vizsgálatával határoztuk meg a következőképpen: a steril fedőlemezeket 10 ml, minimál tápoldatot tartalmazó Petri-csésze aljára süllyesztettük, majd ezek felületére 10^4 db konídiumot cseppentettünk, amelyeket 25 °C-on, egy éjszakán át inkubáltunk. A

fedőlemezre tapadt, kicsírázott micéliumot „Zeiss Axioobserver 7 AxioCam 503 mono detector” fluoreszcens mikroszkóp 09 (DsRed) és 15 (Gfp) filterkészletével vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az AN5316 és AN1402 fehérjék *in silico* domén elemzése

A két C-terminális SYM motívumot hordozó *A. nidulans* fehérje *in silico* domén vizsgálatát a Pfam doménkereső alkalmazással vizsgáltuk (<https://pfam.xfam.org/>).

Az AN1402 fehérje esetén egy enzimaktiváshoz kapcsolható funkcionális domént azonosítottunk, mely a maltóz acetil transzferáz domén családba tartozik (pfam azonosítója: PF12464).

Az AN5316 fehérjének nincs ismert doménje.

4.2. A Gfp SYM és SRL motívummal történő jelölése, fúziója AN5316-tal és AN1402-vel, majd klónozása pAN-HZS-vektorba

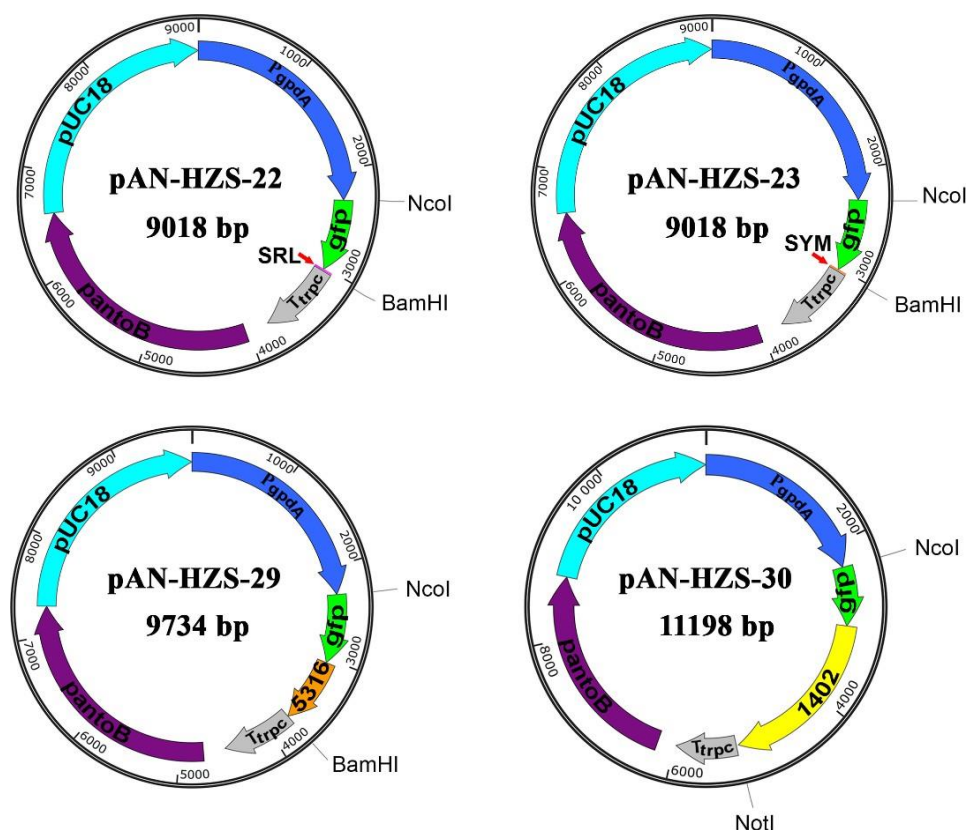
Ahhoz, hogy válaszoljunk arra a kérdésre, hogy a C-terminális SYM motívum a növényekhez hasonlóan a gombákba is bejuttatja-e a fehérjét a peroxiszómába, a Gfp riporter fehérje használatával terveztünk egy lokalizációs vizsgálatot elvégezni. Ehhez a Gfp C-terminálisára SYM motívumot építettünk, a motívumot a stop kodon előtt hordozó reverz primert használó PCR alkalmazásával és a PCR termék expressziós vektorba történő klónozásával (lásd alábbiak). Pozitív kontrollként ugyanígy jártunk el, csak a Gfp C-terminálisára az ismert kanonikus SRL PTS-1 motívumot építettük (lásd alábbiak). Azért, hogy további bizonyítékul szolgáljunk arra, hogy a SYM hordozása a C-terminálison peroxiszóma lokalizációt eredményez, létrehoztuk az *A. nidulans*-ban azonosított mindössze két SYM C-terminális motívummal rendelkező fehérje N-terminális Gfp fúziós konstrukcióját és transzformálást követően ezek lokalizációjának vizsgálatát. Az alábbiak szerint építettük meg a transzformáló konstrukciókat.

A klónozáshoz használt *A. nidulans* integratív kiindulási vektor (pAN-HZS-1) a *gpdA* gén konstitutív promóterét (P_{gpdA}) hordozza, mely a klónozott gének folyamatos transzkripcióját biztosítja fejlődési állapottól, az alkalmazott szén- és nitrogénforrástól, vagy környezeti tényezőktől függetlenül.

Az SRL és SYM epitóppal jelölt Gfp-t kódoló szekvencia létrehozásához „5gfp NcoI start frw” forward primer és „GFP-SRL-BamHI R” reverz primer (Gfp-SRL esetén), illetve „GFP-SYM-BamHI R” reverz primer (Gfp-SYM esetén) használatával PCR reakciót hajtottunk végre a Gfp kódoló szekvenciáját hordozó pAN-HZS-1 plazmid DNS-t használva templátként. A PCR termékeket, valamint a pAN-HZS-1 vektort NcoI-BamHI-el emésztettük, és agaróz gélen történő elektroforézist követően az emésztett fragmentumok DNS tartalmát a gélről visszaizoláltuk, majd a PCR termékeket ligáltuk a vektorba. A ligálási reakciók *E. coli*-ba transzformálását követően az ampicillines LB tápoldaton szelektált transzformánsok plazmid DNS tartalmát izoláltuk és a plazmid DNS-ek NcoI- BamHI emésztésével és agaróz gélelektroforézisével azonosítottuk a sikeres klónokat. A Gfp-SRL-t

hordozó vektort pAN-HZS-22-nek, a Gfp-SYM-et hordozó vektort pAN-HZS-23-nak neveztük el (7.ábra).

Az AN5316 és AN1402 fehérjék esetén a Gfp-t a fehérjék N-terminálisával fúzionáltuk úgy, hogy a fúziós partnerek közé 6 összekötő, ún. linker aminosavat építettünk (a linker szekvenciáját az érintett primerek az 5' végükön hordozták). A fúziót nem klónozással, hanem a *gfp* és AN5316, illetve *gfp* és 1402 individuális PCR termékek „double-joint PCR” módszerrel⁸³ történő összeszerelésével valósítottuk meg. A *gfp* komponens PCR-éhez az „1pGpd int frw” és „22 gfp linker kim rev” primereket használtuk, az AN5316 komponens PCR-éhez a „link kim 5316 F” és „AN5316 down rev” primereket, az AN1402 komponens PCR-éhez pedig a „link kim 1402 F” és „AN1402 down rev” primereket. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézist követően gélből visszaizoláltuk, majd „double-joint PCR” reakcióban használtuk fel templátként, a *gfp* komponenssel specifikus forward („5 gfp NcoI start frw”), valamint az AN5316, illetve AN1402 komponensre specifikus reverz primerekkel („AN5316 BamHI rev” és „AN1402 NotI rev”). A „double-joint PCR” reakció első ciklusában a két individuális komponens az átfedő szekvenciartalmuknál fogva egymás primereiként fognak viselkedni, és a DNS polimeráz feltölti mind a két DNS szál hiányzó komplementerét. A második ciklustól már ez az összeszerelt molekula templátként szolgál a további ciklusokban és amplifikálódik a reakcióelegy forward és reverz primerei által. Az így felszaporított Gfp-AN5316 fúziós terméket NcoI-BamHI, a Gfp-AN1402 fúziós terméket pedig NcoI-NotI restrikciós endonukleázzal emésztettük és NcoI-BamHI, illetve NcoI-NotI emésztett pAN-HZS-1 vektorba klónoztuk. A Gfp-AN5316-t kifejező vektort pAN-HZS-29-nek, a Gfp-AN1402-t kifejező vektort pedig pAN-HZS-30-nak neveztük (7. ábra).



7. ábra: A transzformációs vektorok vázlatos ábrázolása, amelyeket az *A. nidulans*-ban előforduló SYM-motívum és a C-terminális SYM motívumot hordozó fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálatához és kontrollként használtunk fel.

Az eredeti pAN-HZS-1 vektort használtuk a pAN-HZS-22 (SRL epitóppal jelölt Gfp (kontroll)), pAN-HZS-23 (SYM epitóppal jelölt Gfp), pAN-HZS-29 (AN5316 fehérjével fúzionált Gfp) és a pAN-HZS-30 (AN1402 fehérjével fúzionált Gfp) vektorok elkészítéséhez. A klónozáshoz használt egyedi restriktív motívumok láthatók a körkörös sémák mellett. A színes nyilak a vektorok releváns komponenseit mutatják, a nyílhegyek az orientációt jelzik. A vektorok nevei és méretei a körkörös sémákon belül találhatóak. pUC18: standard *E. coli* vektor; PgpA: *A. nidulans*-ból származó *gpdA* gén (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz kódoló gén) konstitutív promotere; gfp: a Gfp (zöld fluoreszcens fehérje) kódoló génje; Ttrpc: A *trpC* gén (triptofán bioszintézis génje) terminációs szekvenciája *A. nidulans*-ból; pantoB: *A. nidulans*-ból származó vad típusú *pantoB* gén (a pantoténsav bioszintézis génjét kódolja), amely szelekciós markergénként szolgál a transzformációhoz

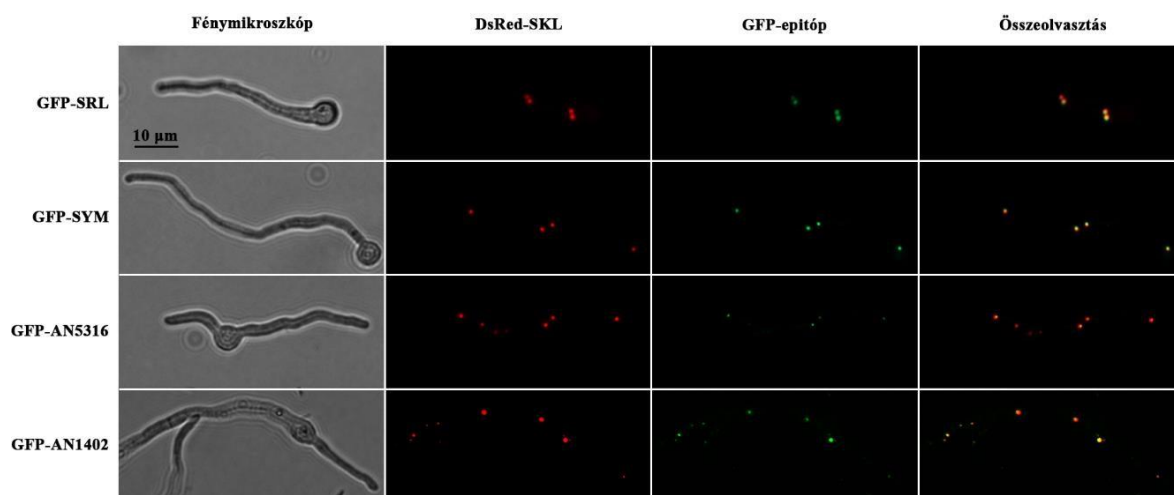
4.3. A keletkezett vektorok transzformálása *A. nidulans*-ba

A transzformációhoz létrehozott pAN-HZS-22, pAN-HZS-23, pAN-HZS-29 és pAN-HZS-30 vektorok maxi-preparátumát „pDsRed-SKL-*argB*” expressziós plazmidot integrált *pantoB100 biA1 pabaA1* genotípusú *A. nidulans* törzsbe (HZS. 572) transzformáltuk. Az SKL epitóp (kanonikus PTS-1 motívum) a DsRed piros fluoreszcens fehérjét a peroxisómába irányítja, így a peroxisómák piros

fluoreszcens jelet mutatnak. Mivel a vektorokban jelen van a szelekciót szolgáló *pantoB*⁺ markergén, csak azok a protoplasztok tudnak telepet képezni a pantoténsavat nem tartalmazó szelekciós táptalajon, amelyekbe a transzformáló vektor beépült a genomba. A transzformálások eredményeként az SRL-Gfp-t kifejező transzformánsokból 3 törzset, a SYM-Gfp-t kifejező transzformánsokból 4 törzset, a Gfp-AN5316-ot kifejező transzformánsokból 8 törzset, míg a Gfp-AN1402-öt kifejező transzformánsokból 1-et sikerült izolálnunk. A transzformánsokból ezután monoklonális tisztanyészetet hoztunk létre és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk az epitóp jelölt Gfp fúziós fehérjék lokalizációját.

4.4. Epitóppal jelölt GFP fúziós fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata

A transzformáns törzsek monoklonális tenyészeiről gyűjtött konídiospórákat fedőlemezen, minimál tápoldatba süllyesztettük, majd az inkubációt követően a fiatal, primér hifákat mutató tenyészetekből mikroszkópos preparátumokat készítettünk és vizsgáltunk fluoreszcens mikroszkópban. Mivel a Gfp-fúziós konstrukciók olyan *A. nidulans* recipiens törzsbe lettek transzformálva, melyek transzgenikusan SKL-el jelölt (C-terminálison) DsRed fehérjét fejeztek ki, ezért a peroxiszómák a transzformáns törzsekben piros fluoreszcenciát mutatnak. A transzformáns törzsek genomjába beépült transzgenikus Gfp-fúziós konstrukciók kifejeződésekor zölden fluoreszkáló jelet kaptunk, melynek lokalizációját összevetettük a piros fluoreszcenciát kibocsájtó peroxiszómák lokalizációjával. A kontrollként SRL (kanonikus PTS-1) epitóppal (C-terminálison) jelölt Gfp-t kifejező mindhárom transzformánsban a zöld fluoreszcens jel egybeesett a peroxiszómák piros fluoreszcens jelével (8. ábra). A tesztelendő SYM epitóppal (C-terminálison) jelölt Gfp-t kifejező 4 transzformáns mindegyikében a zöld fluoreszcens jel egybeesett a peroxiszómák piros jelével (8. ábra). Ez önmagában igazolta, hogy a C-terminálison prezentált SYM egy működő PTS-1 szignál. Az *A. nidulans in silico* elemzésével azonosított két, SYM C-terminális motívumot hordozó AN1402, illetve AN5316 fehérjék N-terminális Gfp fúziós konstrukcióinak transzgenikus kifejeződése az összes transzformánsban a Gfp jel peroxiszómákkal történő kolokalizációját mutatta (8. ábra). Ezek az eredmények egyrészt igazolták, hogy a SYM motívumot nem csak a növények, hanem a gombák PTS-1 gépezete is felismeri és bejuttatja a peroxiszóma mátrixába, másrészt pedig két eddig nem vizsgált fehérje peroxiszómális lokalizációját is igazoltuk *A. nidulans*-ban.



8. ábra: A Gfp-SRL, Gfp-SYM, Gfp-AN5316 és Gfp-1402 fúziós fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával

GFP-SRL: SRL epitóppal jelölt Gfp (kontroll); GFP-SYM: SYM epitóppal jelölt Gfp; GFP-AN5316: Gfp-vel fúzionált AN5316 fehérje; GFP-AN1402: Gfp-vel fúzionált AN1402 fehérje. A fedőlemezekre oltott konídiospórákat 25 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk minimál tápoldatban. A preparátumokat „Zeiss Axioobserver 7 AxioCam 503 mono detector” fluoreszcens mikroszkóp 09 (DsRed) és 15 (Gfp) filterkészletével vizsgáltuk.

A továbbiakban tervezzük a transzformánsok genomi DNS-ének tisztítását és a transzgén kópiaszám vizsgálatát (qPCR-rel). Mivel két eddig nem vizsgált funkciójú fehérje intracelluláris lokalizációját igazoltuk, ezt követően érdekes lenne a fehérjék élettani szerepét is megvizsgálni a kódoló gének deléciójával és a deléciós törzsek fenotípus vizsgálatával.

5. EREDMÉNY ÖSSZEFOGLALÁS

Annak ellenére, hogy évtizedek óta kutatják a peroxiszómális funkciókat, napjainkban is csak a peroxiszómákban történő reakciók töredékét ismerjük. Ezek főleg a dominánsan előforduló reakciók. A fajspecifikus, vagy speciális környezeti körülményeket igénylő növények és gombák metabolikus sokszínűsége miatt azonban számos olyan folyamat köthető a peroxiszómákhoz, melyekről sem számukat tekintve, sem pedig a reakciókban résztvevő fehérjéket tekintve még nincsenek adataink. Mind a mai napig akad egy újabb és újabb biológiai folyamat, melyről kiderül, hogy a peroxiszómában zajlik. Ilyen például a 6-hidroxi nikotinsav átalakítása 2,5-dihidroxi piridénné *A. nidulans*-ban, melyet a nikotinsav katabolikus útvonal egyik enzime, a HxnX enzim (6-hidroxi nikotinsav monooxygenáz) végez⁸⁴. A peroxiszómális lokalizációs vizsgálatok igen nagy jelentőséggel bírnak, mert bár léteznek olyan mikroba modellszervezetek (*S. cerevisiae*), melyeken nagy áteresztőképességű kísérletes módszerekkel fel lehet térképezni a peroxiszómákban lokalizálódó fehérjéket⁶⁹, a tesztorganizmusok többségében (akár növény, akár gomba) ilyen technikák nem alkalmazhatóak, a biztos predikciót pedig csak egy tökéletesített PTS motívum lista segítheti elő. Ilyen körülmények között felkeltette érdeklődésünket egy növényekre specifikus, ritkán előforduló PTS-1 szignál, a SYM³⁹. A *S. cerevisiae* modellszervezetben nincs fehérje, melynek a C-terminálisa a SYM motívumot hordozza, ezért a nagy áteresztőképességű vizsgálatoknál nem is került fel kérdésként, hogy vajon PTS-ként működik-e gombákban is a SYM motívum? Az *A. nidulans* annotált genomjának *in silico* átvizsgálásával összesen két olyan fehérjét tudtunk azonosítani, melyek C-terminálisán SYM motívum található (AN1402 és AN5316). Ezért felvetődött annak a lehetősége, hogy a SYM az nem kizárólagos növényi PTS, hanem ennél szélesebb körben, a gombákban is PTS-ként szolgál. Ennek igazolására Gfp riporter fehérjét jelöltünk SYM epitóppal a C-terminálisán, valamint létrehoztuk az AN1402 és AN5316 fehérjék N-terminális Gfp fúzióját. Az epitóp jelölt, illetve fúziós fehérjéket olyan *A. nidulans* törzsben fejeztettük ki, mely konstitutívan kifejezte a peroxiszóma lokalizációs szignállal jelölt DsRed fehérjét (dsRed-SKL). Az epitóp jelölt, illetve fúziós fehérjék Gfp jele minden vizsgált transzformáns törzsben átfedést mutatott a peroxiszómákban világító piros DsRed-SKL jellel. Ezzel bizonyítottuk, hogy a SYM egy gombákban is működő PTS-1 szignál, továbbá két eddig nem vizsgált fehérjéről bizonyítottuk, hogy a peroxiszómákban lokalizálódnak.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Lazarow, P. B. & Fujiki, Y. Biogenesis of Peroxisomes. *Annual Review of Cell Biology* **1**, 489–530 (1985).
2. Wanders, R. J. A. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* **98**, 36–44 (2014).
3. Fransen, M. Peroxisome Dynamics: Molecular Players, Mechanisms, and (Dys)functions. *ISRN Cell Biology* **2012**, 714192 (2012).
4. Rhodin, J. A. G. Correlation of ultrastructural organization: and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney: an electron microscopic study. (Dept. of Anatomy, Karolinska Institutet, 1954).
5. De Duve, C. & Baudhuin, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**, 323–357 (1966).
6. Woronin, M. S. in *Zur Entwicklungsgeschichte der Ascobolus pulcherrimus Cr. und einiger Pezizen* vol. 5 333–344 (Abh. Senkenb. Naturforsch., 1864).
7. Collinge, A. J. & Markham, P. Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. *Experimental Mycology* **9**, 80–85 (1985).
8. Trinci, A. P. J. & Collinge, A. J. Occlusion of the septal pores of damaged hyphae of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals. *Protoplasma* **80**, 57–67 (1974).
9. Kiel, J. A., Hilbrands, R. E., Bovenberg, R. A. & Veenhuis, M. Isolation of *Penicillium chrysogenum* PEX1 and PEX6 encoding AAA proteins involved in peroxisome biogenesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 238–242 (2000).
10. de Duve, C. The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nat Rev Genet* **8**, 395–403 (2007).
11. Gabaldón, T. Peroxisome diversity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 765–773 (2010).
12. Gould, S. J., Keller, G.-A. & Subramani, S. Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *Journal of Cell Biology* **105**, 2923–2931 (1987).
13. Hayashi, M. *et al.* Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochemistry and Biophysics* **32**, 295–304 (2000).
14. Michels, P. A. M., Bringaud, F., Herman, M. & Hannaert, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1463–1477 (2006).
15. Terlecky, S. R. & Titorenko, V. I. Emergent functions of the peroxisome. *Research Signpost, Kerala, India* (2009).
16. Cooper, T. G. & Beevers, H. Beta oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *J Biol Chem* **244**, 3514–3520 (1969).
17. Lazarow, P. B. & De Duve, C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2043–2046 (1976).
18. Ueda, M., Yamanoi, K., Morikawa, T., Okada, H. & Tanaka, A. Peroxisomal Localization of Enzymes Related to Fatty Acid β -Oxidation in an n-Alkane-grown Yeast, *Candida tropicalis*. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 1821–1828 (1985).
19. Shi, X. & Bloom, A. Photorespiration: The Futile Cycle? *Plants* **10**, (2021).

20. Hu, J. *et al.* Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. *The Plant Cell* **24**, 2279–2303 (2012).
21. Kaur, N., Reumann, S. & Hu, J. Peroxisome biogenesis and function. *The Arabidopsis Book* **7**, 1–41 (2009).
22. Reumann, S., Chowdhary, G. & Lingner, T. Characterization, prediction and evolution of plant peroxisomal targeting signals type 1 (PTS1s). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**, 790–803 (2016).
23. Magliano, P., Flipphi, M., Arpat, B. A., Delessert, S. & Poirier, Y. Contributions of the Peroxisome and β -Oxidation Cycle to Biotin Synthesis in Fungi*. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 42133–42140 (2011).
24. Tanabe, Y. *et al.* Peroxisomes Are Involved in Biotin Biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis**. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 30455–30461 (2011).
25. Babujee, L. *et al.* The proteome map of spinach leaf peroxisomes indicates partial compartmentalization of phyloquinone (vitamin K1) biosynthesis in plant peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1441–1453 (2010).
26. Kim, H. U., Oostende, C. V., Basset, G. J. C. & Browse, J. The AAE14 gene encodes the *Arabidopsis* *o*-succinylbenzoyl-CoA ligase that is essential for phyloquinone synthesis and photosystem-I function. *Plant Journal* **54**, 272–283 (2008).
27. Reumann, S. Biosynthesis of Vitamin K1 (Phylloquinone) by Plant Peroxisomes and Its Integration into Signaling Molecule Synthesis Pathways. in *Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism* (ed. del Río, L. A.) 213–229 (Springer Netherlands, 2013). doi:10.1007/978-94-007-6889-5_12.
28. Widhalm, J. R. *et al.* Phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis in plants: Two peroxisomal thioesterases of lactobacillales origin hydrolyze 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coa. *Plant Journal* **71**, 205–215 (2012).
29. Colquhoun, T. A. *et al.* A peroxisomally localized acyl-activating enzyme is required for volatile benzenoid formation in a *Petunia*×*hybrida* cv. ‘Mitchell Diploid’ flower. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4821–4833 (2012).
30. Gaid, M. M. *et al.* Cinnamate:CoA Ligase Initiates the Biosynthesis of a Benzoate-Derived Xanthone Phytoalexin in *Hypericum calycinum* Cell Cultures. *Plant Physiology* **160**, 1267–1280 (2012).
31. Klempien, A. *et al.* Contribution of CoA Ligases to Benzenoid Biosynthesis in *Petunia* Flowers. *The Plant Cell* **24**, 2015–2030 (2012).
32. Kliebenstein, D. J. *et al.* Characterization of seed-specific benzoyloxyglucosinolate mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **51**, 1062–1076 (2007).
33. Lee, S. *et al.* Benzoylation and sinapoylation of glucosinolate R-groups in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **72**, 411–422 (2012).
34. Moerkercke, A. V., Schauvinhold, I., Pichersky, E., Haring, M. A. & Schuurink, R. C. A plant thiolase involved in benzoic acid biosynthesis and volatile benzenoid production. *The Plant Journal* **60**, 292–302 (2009).
35. Qualley Anthony V., Widhalm Joshua R., Adebisin Funmilayo, Kish Christine M., & Dudareva Natalia. Completion of the core β -oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 16383–16388 (2012).

36. Brocard, C. & Hartig, A. Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**, 1565–1573 (2006).
37. Gould, S. J., Keller, G.-A., Hosken, N., Wilkinson, J. & Subramani, S. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *Journal of Cell Biology* **108**, 1657–1664 (1989).
38. Lametschwandtner, G. *et al.* The Difference in Recognition of Terminal Tripeptides as Peroxisomal Targeting Signal 1 between Yeast and Human Is Due to Different Affinities of Their Receptor Pex5p to the Cognate Signal and to Residues Adjacent to It*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 33635–33643 (1998).
39. Lingner, T. *et al.* Identification of Novel Plant Peroxisomal Targeting Signals by a Combination of Machine Learning Methods and in Vivo Subcellular Targeting Analyses. *The Plant Cell* **23**, 1556–1572 (2011).
40. Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A. & Eisenhaber, F. Motif Refinement of the Peroxisomal Targeting Signal 1 and Evaluation of Taxon-specific Differences. *Journal of Molecular Biology* **328**, 567–579 (2003).
41. Swinkels, B. W., Gould, S. J. & Subramani, S. Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Letters* **305**, 133–136 (1992).
42. Flynn, C. R., Mullen, R. T. & Trelease, R. N. Mutational analyses of a type 2 peroxisomal targeting signal that is capable of directing oligomeric protein import into tobacco BY-2 glyoxysomes. *Plant Journal* **16**, 709–720 (1998).
43. Kato, A., Hayashi, M., Kondo, M. & Nishimura, M. Targeting and processing of a chimeric protein with the N-terminal presequence of the precursor to glyoxysomal citrate synthase. *Plant Cell* **8**, 1601–1611 (1996).
44. Kato, A. *et al.* Glyoxysomal Malate Dehydrogenase in Pumpkin: Cloning of a cDNA and Functional Analysis of Its Presequence. *Plant and Cell Physiology* **39**, 186–195 (1998).
45. Kunze, M. *et al.* Structural Requirements for Interaction of Peroxisomal Targeting Signal 2 and Its Receptor PEX7*. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 45048–45062 (2011).
46. Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A. & Subramani, S. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *The EMBO Journal* **10**, 3255–3262 (1991).
47. Adoutte André *et al.* The new animal phylogeny: Reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 4453–4456 (2000).
48. Faust, J. E., Verma, A., Peng, C. & McNew, J. A. An Inventory of Peroxisomal Proteins and Pathways in *Drosophila melanogaster*. *Traffic* **13**, 1378–1392 (2012).
49. Gonzalez, N. H. *et al.* A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. *PLoS One* **6**, e25316 (2011).
50. Motley, A. M., Hettema, E. H., Ketting, R., Plasterk, R. & Tabak, H. F. *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO Rep* **1**, 40–46 (2000).
51. Shinozaki, A., Sato, N. & Hayashi, Y. Peroxisomal targeting signals in green algae. *Protoplasma* **235**, 57–66 (2009).

52. Distel, B. *et al.* A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *Journal of Cell Biology* **135**, 1–3 (1996).
53. Hayashi, M., Yagi, M., Nito, K., Kamada, T. & Nishimura, M. Differential Contribution of Two Peroxisomal Protein Receptors to the Maintenance of Peroxisomal Functions in Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 14829–14835 (2005).
54. Kragler, F., Lametschwandtner, G., Christmann, J., Hartig, A. & Harada, J. J. Identification and analysis of the plant peroxisomal targeting signal 1 receptor NtPEX5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13336–13341 (1998).
55. Wimmer, C., Schmid, M., Veenhuis, M. & Gietl, C. The plant pts1 receptor: Similarities and differences to its human and yeast counterparts. *Plant Journal* **16**, 453–464 (1998).
56. Walter, T. & Erdmann, R. Current Advances in Protein Import into Peroxisomes. *The Protein Journal* **38**, 351–362 (2019).
57. Lee, M. S., Mullen, R. T. & Trelease, R. N. Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *The Plant Cell* **9**, 185–197 (1997).
58. Glover J R, Andrews D W, & Rachubinski R A. Saccharomyces cerevisiae peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 10541–10545 (1994).
59. Antonenkov, V. D., Grunau, S., Ohlmeier, S. & Hiltunen, J. K. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid Redox Signal* **13**, 525–537 (2010).
60. Fodor, K., Wolf, J., Erdmann, R., Schliebs, W. & Wilmanns, M. Molecular requirements for peroxisomal targeting of alanine-glyoxylate aminotransferase as an essential determinant in primary hyperoxaluria type 1. *PLoS Biol* **10**, e1001309 (2012).
61. Hayashi, M., Aoki, M., Kondo, M. & Nishimura, M. Changes in Targeting Efficiencies of Proteins to Plant Microbodies Caused by Amino Acid Substitutions in the Carboxy-terminal Tripeptide. *Plant and Cell Physiology* **38**, 759–768 (1997).
62. Maynard, E. L., Gatto, G. J. J. & Berg, J. M. Pex5p binding affinities for canonical and noncanonical PTS1 peptides. *Proteins* **55**, 856–861 (2004).
63. Mullen, R. T., Lee, M. S., Flynn, C. R. & Trelease, R. N. Diverse amino acid residues function within the type 1 peroxisomal targeting signal. Implications for the role of accessory residues upstream of the type 1 peroxisomal targeting signal. *Plant Physiol* **115**, 881–889 (1997).
64. Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A. & Eisenhaber, F. Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol* **328**, 581–592 (2003).
65. Reumann, S. Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol* **135**, 783–800 (2004).
66. Skoulding, N. S. *et al.* Experimental validation of plant peroxisomal targeting prediction algorithms by systematic comparison of in vivo import efficiency and in vitro PTS1 binding affinity. *J Mol Biol* **427**, 1085–1101 (2015).

67. Reumann, S. Toward a definition of the complete proteome of plant peroxisomes: Where experimental proteomics must be complemented by bioinformatics. *Proteomics* **11**, 1764–1779 (2011).
68. Smith, J. J. *et al.* Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *Journal of Cell Biology* **158**, 259–271 (2002).
69. Huh, W.-K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691 (2003).
70. Schäfer, H., Nau, K., Sickmann, A., Erdmann, R. & Meyer, H. E. Identification of peroxisomal membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS* **22**, 2955–2968 (2001).
71. Yi, E. C. *et al.* Approaching complete peroxisome characterization by gas-phase fractionation. *ELECTROPHORESIS* **23**, 3205–3216 (2002).
72. van der Klei, I. J. & Veenhuis, M. Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**, 1364–1373 (2006).
73. Imazaki, A. *et al.* Contribution of peroxisomes to secondary metabolism and pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Eukaryot Cell* **9**, 682–694 (2010).
74. Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H. & Nishimura, M. A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49**, 1272–1282 (2008).
75. Nishikawa, M. *et al.* Primary structure and expression of peroxisomal acetylspermidine oxidase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *FEBS Letters* **476**, 150–154 (2000).
76. Ono, Y. *et al.* Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion. *Amino Acids* **42**, 867–876 (2012).
77. Saikia, S. & Scott, B. Functional analysis and subcellular localization of two geranylgeranyl diphosphate synthases from *Penicillium paxilli*. *Mol Genet Genomics* **282**, 257–271 (2009).
78. Wu, T., Yankovskaya, V. & McIntire, W. S. Cloning, Sequencing, and Heterologous Expression of the Murine Peroxisomal Flavoprotein, N1-Acetylated Polyamine Oxidase*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 20514–20525 (2003).
79. Cove, D. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation* **113**, 51–56 (1966).
80. Antal, Z., Manczinger, L. & Ferenczy, L. Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology Techniques* **11**, 205–208 (1997).
81. Ferenczy, L., Kevei, F. & Szegedi, M. Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia* **31**, 50–52 (1975).
82. Kevei, F. & Peberdy, J. F. Interspecific Hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by Fusion of Somatic Protoplasts. *Microbiology*, vol. 102 255–262 (1977).
83. Yu, J.-H. *et al.* Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**, 973–981 (2004).
84. Bokor, E. *et al.* Nicotinate degradation in a microbial eukaryote: a novel, complete pathway extant in *Aspergillus nidulans*. *bioRxiv* 2021.08.17.456622 (2021) doi:10.1101/2021.08.17.456622.

7. NYILATKOZAT

36. OTDK Biológia Szekció

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Alczheimer Kevin nyilatkozom, hogy a 36. OTDK Biológia Szekcióra benyújtott „Egy növényekben azonosított, ritkán előforduló peroxiszóma lokalizációs szignál működésének igazolása *Aspergillus nidulans*-ban” című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Rész/feladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
<i>Polimeráz láncreakciók és a transzformáló vektorok elkészítése ligálással</i>	3
<i>PCR termékek tisztítása kit-el</i>	3
<i>Tisztított PCR termékek emésztése, izolálása és vektorba ligálása</i>	3
<i>Agaróz gélelektroforézis</i>	5
<i>E. coli elektrokompetens sejt készítése elektroporációval történő transzformációhoz</i>	5
<i>E. coli transzformáció elektroporációval</i>	5
<i>Plazmid DNS kivonás E. coli transzformáns törzsekből</i>	5
<i>A. nidulans transzformálás</i>	4
<i>Fluoreszcens mikroszkópozás</i>	3

Kelt: Szeged, 2022. április. 11.

Többszerzős dolgozat esetén:

Alzheimer Kevin

Pályamunkát benyújtó hallgató *(név)*

aláírása

Társszerző *(név)*

aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Dr. Hamari Zsuzsanna, Mikrobiológia Tanszék

Témavezető (*név,*
munkahely)

aláírása

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Hamari Zsuzsannának, hogy lehetőséget adott a kutatócsoportjában folytatódó munkába való bekapcsolódáshoz, illetve, hogy gyakorlati és elméleti ismeretekkel is segítette a munkámat.

Köszönöm Suren Nemuuzayanak hogy PhD munkájában való részvétellel el tudtam készíteni a dolgozatomat.

Köszönöm Dr. Ámon Juditnak és Varga Gabriellának, hogy felügyelték és segítették a munkámat.