

36. OTDK Biológia Szekció

A *whc1* gén szerepének vizsgálata *Coprinopsis cinerea* spóráképzésében

Szekeres Anna Ágnes

Biológia BSc, II. évfolyam

Kutatási intézmény:

Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet

Témavezetők:

Dr. Nagy László

tudományos főmunkatárs, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Dr. Wu Hongli

tudományos munkatárs, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Szeged,

2023.

Bevezetés

A *Coprinopsis cinerea* a Basidiomycota törzs *Coprinopsis* nemzetségbe tartozó fonalas gomba. Nevét az idős termőtestek lemezeiben bekövetkező autolízis során kialakuló fekete, tinta-szerű anyagról kapta. Jellemzősége, hogy az érett spórák feketére színezik a kalap belső felét és a lemezeket. Az utóbbi években számos kutatás foglalkozott az organizmus pontos génfunkcióinak feltérképezésével. Ezen vizsgálatok során megfigyelték három, a kalapban erőteljesen kifejeződő gént, melyek funkciói eddig még ismeretlenek voltak. A dolgozat témája az egyik gén, a „white-cap” (*whc1*) gén működésének vizsgálata molekuláris- és mikrobiológiai eszközökkel. A homológ rekombináció és CRISPR/Cas9 transzformációval létrehozott törzsek kalapjában a vad típustól eltérő tulajdonságok jelentkeztek. A *whc1* gén hiányában fehér és mozaikosan fekete-fehér lemez-fenotípusok megjelenését tapasztaltuk, aminek hátterében feltehetően a spórák kialakulásában, valamint a bazídiumsejtek szerkezetében bekövetkező defektus áll.

Az eredményeink alapján kijelenthető, hogy a *whc1* gén kifejeződése jelentős szerepet játszik a bazidiospórák fejlődésében és így a *C. cinerea* szaporodásában.

Rövidítésjegyzék:

CMM – Coprinopsis Minimális Táptalaj/Tápoldat (*Coprinopsis Minimal Medium*)

CRISPR – Halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

EDTA – Etilén-diamin-tetraecetsav (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

Fw – Előremutató (*Forward*)

FP – Előremutató indítószekvencia (*Forward Primer*)

HMG – *High Mobility Group*

LB – Luria-Bertani

MM – Mannit-Na-Maleát (*Mannitol-Na-Maleate*)

MMC – Mannit-Na-Maleát-CaCl₂ (*Mannitol-Na-Maleate-CaCl₂*)

NHEJ – Nem homológ végek egyesítése (*Non-Homologous End-Joining*)

PCR – Polimeráz (Polimerase Chain Reaction)

PEG – Polietilén-glikol

RegMed – Regenerációs táptalaj (*Regeneration Medium*)

REMI – Restrikciós enzim által közvetített integráció (*Restriction Enzyme-Mediated Integration*)

RT-PCR – reverz transzkripció polimeráz láncreakció

Rev – visszafelé mutató (*Reverse*)

RP – visszafelé mutató indítószekvencia (*Reverse Primer*)

SOC – Glükózzal kiegészített gazdag tápoldat (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)

SOX – SRY-hez kapcsolódó HMG-boksz gének (*SRY-Related GBOkszBox Genes*)

SRY – *Sex-Determining Region Y* fehérje

TAE – Trisz-Acetát-EDTA

YMG – Élesztőkivonat-Maláta-Glükóz (*Yeast extract-Malt extract-Glucose*)

VT – vad típus

Tartalomjegyzék

1. Bevezető	6
1.1. A <i>Coprinopsis cinerea</i> faj ismertetése	6
1.2. A <i>C. cinerea</i> , mint modellorganizmus	7
1.3 A <i>C. cinerea</i> termőtestképzésének folyamata	7
1.4 A termőtestképzés genetikai háttere	9
1. ábra: A termőtestképzés lépéseiben résztvevő <i>C. cinerea</i> transzkripciós faktorok és ezek homológjai. Szürke betűszínnel az ismeretlen, feketével pedig az ismert funkciójú és működésű faktorokat jelöltük.	10
1.5 Transzkripciós faktorok gombákban	11
2. Célkitűzések	13
3. Anyagok és módszerek	14
3.1 Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	14
3.1.1. Baktérium tenyésztéshez használt táptalajok és tápoldatok	14
3.1.2. A <i>C. cinerea</i> tenyésztéséhez felhasznált táptalajok és tápoldatok	14
3.2. Oldatok és reagensek	14
3.2.1 Gibson Assembly során használt oldatok	14
3.2.2. PCR során használt oldatok	15
3.2.3. Agaróz gélelektroforézis során használt oldatok	15
3.2.4. <i>C. cinerea</i> transzformáció során használt oldatok	15
3.3. Alkalmazott indítószekvenciák	15
3.3.1 Transzformációs vektor fragmentumok felszaporításához használt indítószekvenciák	15
3.3.2 Génkiütés vizsgálatának PCR ellenőrzéséhez alkalmazott indítószekvenciák	16
3.4. Tenyésztési körülmények	16
3.4.1. Baktérium tenyésztési körülmények	16
3.4.2 <i>C. cinerea</i> esetén alkalmazott tenyésztési körülmények	16
3.5. Alkalmazott módszerek	17

3.5.1. Polimeráz láncreakció (PCR)	17
3.5.2 PCR fragmentek tisztítása	17
3.5.3. Gibson összeszerelés	17
3.5.4. Baktérium transzformáció	18
3.5.5 Plazmid minipreparátum készítése (MINIprep, 50 µl-es végtérfogatban)	18
3.5.6 A plazmidok nagy mennyiségben történő tisztítása (MIDIprep, 200 µl végtérfogatban)	18
3.5.7. Ribonukleoprotein tervezése és komplex összeszerelése	18
3.5.8 <i>C. cinerea</i> transzformálása	18
3.5.9. DNS kivonás	19
3.5.10 RNS kivonás	19
3.5.11 cDNS szintézise	19
3.5.12 Tiszta genotípusú <i>C. cinerea</i> mutáns törzsek izolálása	20
3.5.13 <i>C. cinerea</i> fenotípusának vizsgálata	20
3.5.14. Bioinformatikai vizsgálatok	20
4. Eredmények és megvitatásuk	22
4.1 Kalapspecifikus transzkripciós faktorok azonosítása	22
4.1.1. Az 142396 azonosítójú transzkripciós faktor azonosítása	22
4.1.2 Az 142396 azonosítójú transzkripciós faktor <i>in silico</i> jellemzése	22
4.1.3 Az 142396 azonosítójú transzkripciós faktor deléciója	24
4.2 Az 142396 transzkripciós faktor deléciós törzs jellemzése	26
4.2.1 A deléciós törzs növekedési sebessége	26
4.2.2 A deléciós törzs termőtestjeinek vizsgálata	27
5. Összefoglalás	31
6. Köszönetnyilvánítás	32
7. Irodalomjegyzék	33

1. Bevezető

1.1. A *Coprinopsis cinerea* faj ismertetése

A *Coprinopsis* nemzetség a Basidiomycota törzs Agaricomycetes osztályának Agaricales rendjének *Psathyrellaceae* családjába tartozó fonalas gombákat foglalja magába (Redhead és mtsai., 2001). A jelenlegi *Coprinopsis* nemzetség a kétezres évek elején a korábbi *Psathyrella* és a *Coprinus* nemzetségek összeolvadásával keletkezett. A legújabb molekuláris filogenetikai adatok ismeretében e gombacsoport jelentős taxonómiai átalakításon esett át, melynek alapján négy nagyobb kládra osztható: a *Coprinus stercorarius sensu*, *Coprinellus*, *Parasola* és *Coprinopsis* nemzetségekre (Redhead és mtsai., 2001). A molekuláris jellegeken kívül, a csoportok elkülönítésében a termőtestek morfológiai jellemzői is szerepet játszottak, például a *pileipellis* – a kalap legfelső kutikularétege – szerkezete és a fátyol jelenléte vagy hiánya (Nagy és mtsai., 2012).

A *Coprinopsis cinerea* viszonylag könnyen felismerhető és meghatározható a természetben, mivel a termőtest számos egyedi morfológiai bélyeggel rendelkezik. Tönkje 5-10 centiméter magas, felszíne szálás és fehér színű, melyen sem bocskor, sem pedig gallér nem alakul ki. Kalapja 1-2 cm széles, kezdetben tojásdad, majd harang alakú, idősebb termőtesteken a szélek felkunkorodnak. A képlet szürkés színű és fiatalon fehér pelyhek borítják, ezek azonban idővel lekopnak. A lemezek szabadon és sűrűn állnak, keskenyek, kezdetben fehér színűek. Ezek a termőtest öregedésével először megszürkülnek, mely a fekete spórapornak köszönhető, majd az itt lejátszódó autolízises folyamatoknak köszönhetően megfeketednek, elfolyósodnak. Erre a jellegzetes tulajdonságra és az így létrejövő, sötét színű, a kalapról lecsöpögő mucinózus folyadékra utal a 'tintagombák' csoportnév (McKnight és mtsai., 1987).

A *Coprinopsis* név *Coprinus*-hoz tartozót jelent, mely megnevezés a görög ‘kópros’-trágya és ‘ópsis’-megjelenés szavak összetételéből jött létre és az ide tartozó fajok gyakori termőhelyeire utal. Ezen információ birtokában belátható, hogy több faj is igen fontos szerepet tölt be az ökoszisztémában, elsősorban szaprofita szervezetekként (Várnai és mtsai., 2018). Bár a faj esetében a lemezekben bekövetkező autolízis miatt az idősebb gombák ehetetlenek, Tájföldön a fiatal termőtesteket gyűjtik, savanyítva forgalmazzák és fogyasztják (Kües, 2007).

1.2. A *C. cinerea*, mint modellorganizmus

A *C. cinerea* faj képviselőit számos tulajdonság teszi kiváló modellorganizmussá. Könnyen tenyészthető laboratóriumi körülmények között, életsiklusa rövid, a leoltástól számított 10-12 napon belül termőtestet képez (Pukkila, 2011). Esetében a genomszekvencia elérhető (Stajich és mtsai., 2010) és számos génexpressziós adat áll rendelkezésre a különféle fejlődési állapotai kapcsán (Burns és mtsai., 2010; Krizsán és mtsai., 2019; Xie és mtsai., 2020). A faj vizsgálatait jelentősen megkönnyíti a különböző génekre elérhető knock-out mutánsok (Muraguchi és mtsai., 1998), valamint a legtöbb termőtestképző gombával ellentétben a *C. cinerea* genetikai elemzéséhez elérhető molekuláris eszközök. A Binneringer által 1987-ben kidolgozott transzformációs eljárás segítségével lehetővé vált a *C. cinerea* genetikai manipulációja (Binneringer és mtsai., 1987), valamint 2017-ben a CRISPR/Cas9 technikát is sikeresen alkalmazták a faj képviselőin (Shi és mtsai., 2017).

1.3 A *C. cinerea* termőtestképzésének folyamata

A gomba termőtestek nagy differenciáltságot mutatnak, az egyszerűbb reszupinátusképző fajoktól a legkomplexebbnek tekinthető kalapos-tönkös (pileate-stipitate) formákig (Virágh és mtsai., 2021). A kalapos-tönkös morfológia vélhetően egyszerűbb képletekből alakulhatott ki az általános evolúciós nyomás hatására (Varga és mtsai., 2019). A kalap megléte adaptív előnyt jelent és számos termőtestképző gombacsoportban egymástól függetlenül jelent meg (Varga és mtsai., 2019), valamint védelmet nyújt és alapot ad a himéniumnak (a gombák termőrétege, melyen a szexuális spórákat létrehozó bazídiumok helyezkednek el). A kalap különféle morfológiákat mutathat, mint a sima-, ráncos-, pórusos-, fogazott-, vagy lemezes himéniumok (Virágh és mtsai., 2021).

A *C. cinerea* fejlődése a többi bazídiumos gombához hasonlóan a bazídiospórákból indul ki, melyek osztódásuk során (az oidiumokhoz hasonlóan) elsődleges monokariotikus, haploid hifát hoznak létre. A hifák növekedési sebessége, külső bélyegei eltérőek a különböző törzsek között, de általánosan megfigyelhető, hogy az elsődleges haploid hifák vékonyak,

keresztmetszetük nagyjából 3 μm (Kües, 2000). Szexuális ciklusuk során az egymással kompatibilis párosodási típusú hifák fúzionálnak (szomatogámia), a sejtmagok azonban nem olvadnak össze, így jön létre a mindkét szülői sejtmagot tartalmazó dikarionotikus hifa. A szaporodási típusok kialakulásáért két lókuszt ('A' és 'B') felelős, melyek több, párosodásban is szerepet játszó gént tartalmaznak. Ilyen gének termékei például a HD1 és HD2 transzkripciós faktorok és különböző feromon receptorok, feromonok (Kües 2000). Stabil és életképes dikarionos hifa csak különböző transzkripciós faktorok dimerizációjával és eltérő feromon-feromon receptor komplexekkel jöhet létre kulcs-zár modellhez hasonlóan (Kües, 2000). Sikeres egyesülés után az 'A' szaporodási típus kontrollálja a dikarionos micélium csatképzését és szinkronizálja a sejtosztódást és a szeptumképzést. A 'B' szaporodási típus a párosodó monokarionos hifavégeken a sejtmag migrációt és a nem csúcsi sejtek csatokkal való fúzióját segíti elő (Swamy és mtsai., 1984), ezt követően a gombák termőteste a dikarionos hifákból alakul ki. A különböző szaporodási típusok inkompatibilitása laborkörülmények között nagyban megnehezítette és lassította a gomba tenyésztését. A probléma megoldására UV mutagenézissel (Muraguchi és mtsai., 1998) létrehozták az *AmutBmut* megnevezésű dupla mutánst, amely mind az 'A', mind a 'B' ivaros lókusztban mutációt hordoz. A törzs homokarionotikus, mely azt jelenti, hogy jellemzően kettő, esetleg három egyforma sejtmag található szeptumonként és azonos típusú hifavégek egyesülése esetén is a vad típusúéval megegyező termőtestet és szaporodóképes spórákat hoz létre (Swamy és mtsai., 1984).

A *C. cinerea* életciklusa során négyféle szaporító képlet jöhet létre. A mono- és dikarionos hifákon is fény indukció hatására aszexuálisan létrejövő egyszakvú szaporító képlet az oidiospóra, vagy oidium (Kües és mtsai., 1998). A természetben a kolóniák gyors szaporodását biztosítják, laboratóriumban pedig rendkívül fontos szerepük van monokarionos hifarészek izolálásában (Kües és mtsai., 2000). A másik ivartalan szaporodási lehetőség a klamidospóra képzés, melyek dikarionos micéliumból képződnek és általában csak egy sejtmagot tartalmaznak. Ezért kísérletesen monokarionos elemek dikarionos micéliumokból való kiválasztásában van szerepük (Kües és mtsai., 2000). Fény hiányában az elsődleges hifacsomókból tápanyagraktározó kitartóképletek, szkleróciumok képződhetnek (Watanabe és mtsai., 2011). A negyedik, ivaros úton létrejövő képlet a *C. cinerea* esetében a termőtest, amelynek himéniumán létrejönnek a bazídiumok, ahol a számfelező osztódást követően létrejönnek a meiospórák (Kües és mtsai., 2000).

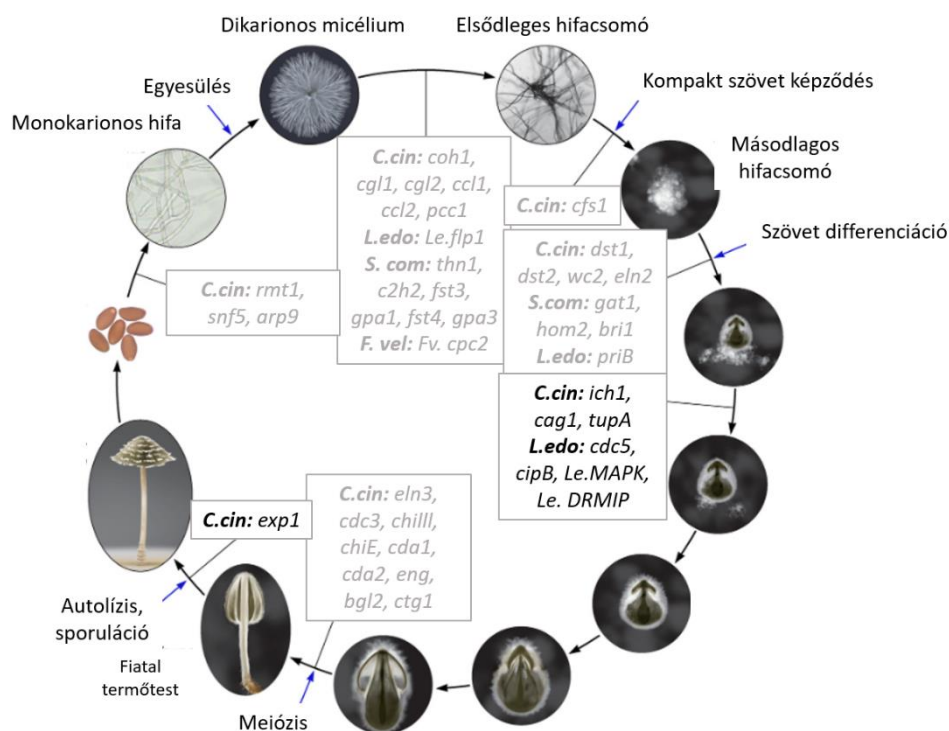
A *C. cinerea* termőtestképzése rendkívül komplex folyamat, amely belső és környezeti hatásokra indul meg a dikarionotikus hifák alkotta micéliumon. Kezdetben az elsődleges hifacsomó alakul ki a dikarionos hifák aggregációjával, mely gömb-szerű, háromdimenziós

struktúrát alkot, melynek kialakulásában nagy szerepe van a fénynek (Kües, 2000). A fény mennyiségének az *AmutBmut* törzs megfelelő oidiumképzésében is jelentős szerepe van (Kües és mtsai., 2016). A belső elhelyezkedésű hifák szövedékéből alakul ki a másodlagos hifacsomó, amely esetében egy nagyobb denzitású belső és egy külső hifaréteget figyeltek meg (Liu és mtsai., 2005). A másodlagos hifacsomóban kezdődik meg a kalap és a tönk sejteinek differenciációja (Moore, 1994), amit öt primordiális állapot követ, melyek regulációjában ugyancsak meghatározó tényező a fény mennyisége. Az első primordiális állapot során alakul ki az elsődleges tönk és kalap, ahol nagy mértékű sejt differenciáció megy végbe. A második primordiális állapotban a primordium gyöngy alakot vesz fel, majd megjelennek az elsődleges lemezek. Az ezt követő állapotok során az egyes gombarészek növekedése, valamint a másodlagos lemezek kialakulása történik meg, a negyedik primordiális állapotra a gomba összes képlete kialakul. A folyamat az ötödik primordiális állapottal ér véget, ahol végbemegy a kariogámia, azaz a dikarionos hifák sejtmagjainak egyesülése, valamint a bazídiumsejtekben a meiózis és ezt követően kialakul a termőtest (Kües, 2000). A fejlődés utolsó 15 órájában a tönk, később pedig a kalap jelentős megnyúlása figyelhető meg (Kamada, 1994), melynek hatására a lemezek elválnak a kalap külső szélétől V-alakba rendeződve. A vad típusú egyedek esetében ezt követi a lemezek autolízise és elfolyósodása.

1.4 A termőtestképzés genetikai háttere

A gombák termőtestképzését számos külső és belső hatás szabályozása alatt áll. Ilyen például a transzkripciók reguláció, a dikarionos hifák párzása, vagy az abiotikus környezet egyes szegmensei, így a szén-dioxid koncentráció, hőmérséklet, vagy a már korábban is részletezett fénymennyiség. Ezek vizsgálatára rendkívül hasznos lehet különböző specifikus mutánsok létrehozása és megfigyelése, melyek gyakran alkalmazott eszközei az előremutató '*forward*' és visszafelé mutató '*reverse*' genetikai módszerek. Egy nagyszabású '*forward*' genetikai kísérlet során Muraguchi és munkatársai (1999) UV mutagenzissel hoztak létre a termőtestképzésben defektusokat mutató gomba törzseket. Ezeket 9 csoportba sorolták: 1) mutánsok, ahol az öreg hifák autolizálnak és a légi hifák redukáltak; 2) hifacsomót nem képző; 3) és primordium mentes mutánsok; 4) a primordiumok termőtestté fejlődésének defektusa; 5) mutánsok, ahol a tönk, 6) és ahol a kalap nem nyúlik meg; 7) bazidiospórát nem képző, spóramentes törzsek; 8) kombinált mutánsok, ahol több, már felsorolt mutáció is bekövetkezett és 9) egyéb mutánsok (Muraguchi és mtsai., 1999; Virágh és mtsai., 2021). A gombák életciklusa során végbemenő folyamatok szabályozásáról jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre, azonban a különböző mutáns törzsekben megfigyelhető változások alapján

következtetni tudunk az egyes gének funkciójára (**1. ábra**). Ilyen gének többek között az elsődleges hifacsomók fejlődésében szerepet játszó *coh1* (Asgeirsdóttir és mtsai., 1997) és *pcc1* (Murata és mtsai., 1998) *C. cinerea*-ban, valamint *thn1* (Raper és mtsai., 1958; Wessels és mtsai., 1991), *gpa1* és *gpa3* *Schizophyllum commune*-ban (Yamagishi és mtsai., 2002). Fejlődéstanilag ezt a másodlagos hifacsomó kialakulása követi, amelyért *C. cinerea* esetében a *cfs1* (Liu és mtsai., 2006), a primordium képzésben pedig ugyancsak *C. cinerea*-ban a *dst1* és *dst2* (Terashima és mtsai., 2005), *S. commune* esetében a *bri1*, *c2h2*, *fst3*, *fst4*, *hom1*, *hom2*, *gat1* (Ohm és mtsai., 2011) gének szerepe jelentős. A fiatal termőtest létrehozásában a meiózis és a tönk megnyúlása közben a jelentősen kifejeződő gének a *C. cinerea* törzsekben a *cdc3* (Shioya és mtsai., 2013), *cda1*, *cda2* (Wang és mtsai., 2018) és *ctg1* (Nakazawa és mtsai., 2009) gének. Muraguchi és mtsai. 2008-ban a tönk megnyúlásában, a kalap expanziójában és a lemezek autolízisében defektes *C. cinerea* mutánt izoláltak. Ebben az esetben a 2 HMG-box domain-nel rendelkező gén, az *exp1* esetében változott meg a genetikai kód.



1. ábra: A termőtestképzés lépéseiben résztvevő *C. cinerea* transzkripciós faktorok és ezek homológjai. Szürke betűszínnel az ismeretlen, feketével pedig az ismert funkciójú és működésű faktorokat jelöltük.

A differenciálódás és kalapfejlődés a gombák életciklusának rendkívül komplex, kevésbé ismert folyamatai. A mai ismereteink elsősorban deléciós mutáns törzsek vizsgálatán

alapul, például a vad típusú *C. cinerea* törzsből spontán létrejött, úgynevezett *ichijiku* mutáns, ahol a lemezek nem differenciálódnak és nem jönnek létre bazidiospórák (Muraguchi és mtsai., 1998). A gén (*ich1*) egy metiltranszferáz és egy DNS kötő doménnel rendelkező fehérjét kódol, de ennek szerepe még nem tisztázott (Muraguchi és mtsai., 1998). Egy másik, szintén *C. cinerea* törzsben azonosított, a kalapfejlődésben szerepet játszó gén a *cag1*. A gén a *Saccharomyces cerevisiae* *tup1* génjének homológja, szerepe a szexuális és aszexuális fejlődésben egyaránt ismert (Todd és mtsai., 2003; Elías-Villalobos és mtsai., 2011). A gén paralógjával, a *Cc.tupA*-val együtt a fejlődő lemezekben található meg nagy mennyiségben (Masuda és mtsai., 2016) ezért feltételezik, hogy a gombák lemezeinek differenciálódási folyamataiban van jelentősége.

Lentinula edodes-ben felfedezett transzkripciós faktor a *cdc5*, mely egyes hipotézisek szerint a kalap differenciálódásában játszhat szerepet. Immunkémiai módszerekkel végzett vizsgálatok során megfigyelték, hogy a gén a primordiumban, és az éretlen termőtestben alacsony-, a himenofór fejlődési helyén viszont magas szinten expresszálódik (Nakazawa és mtsai., 2008). Emberben (Ajuh és mtsai., 2000), *Schizosaccharomyces pombe*-ban és *S. cerevisiae*-ben (Burns és mtsai., 1999) megtalálható ortológjai elengedhetetlenek az RNS-intron kivágódásához.

A bazídiumok differenciálódásának vizsgálatára *Cryptococcus neoformans* bazídiumos élesztőben létrehozták a deléciós *pum1* mutánst (Wang és mtsai., 2014). A Pum1 alapvetően egy RNS kötő doménnel rendelkező fehérje, melynek fontos szerepe van a sporulációban és a bazídium differenciálódásban is (Wang és mtsai., 2014). A mutánsokban a bazídium morfogenezise súlyos károsodást szenvedett és indukálódott a *csa2* gén expressziója, mely koordinálja a meiózist és a bazídium érését (Liu és mtsai., 2018). *Flammulina filiformis* esetében 5 különböző *pum1* homológot figyeltek meg, melyek közül kettő expressziója igen magas volt a kalapban, ahol a bazidiospóra differenciálódás is történik (Liu és mtsai., 2018). Elmondható azonban, hogy alapvetően rendkívül hiányosak az ismereteink a kalap fejlődését, illetve a bazídium differenciálódási folyamatokat tekintve.

1.5 Transzkripciós faktorok gombákban

Soksejtű élőlényekben a kalap expresszióját szabályozó transzkripciós faktorok elengedhetetlenek a tér- és időbeli differenciálódási és a sejtek együttműködési folyamataiban (Grosberg és Strathmann, 2007). Számos bizonyíték létezik a különböző transzkripciós faktorok szerepére a gombák termőtestképzése során (Vonk és Ohm, 2018), azonban a legtöbb transzkripciós faktor funkcióját és termőtestképzésben betöltött szerepét nem ismerjük (Krizsán

és mtsai., 2019). A termőtestképzésben szerepet játszó transzkripciós faktorok és azok regulációs hálózatainak megismerése jelentős mértékben hozzájárulna a termőtestképzés genetikai hátterének megismeréséhez.

2. Célkitűzések

A gombák termőtestjei szövetekre tagolódnak és bizonyos sejtjeik speciális funkciók elvégzésére differenciálódnak. A termőtest egy speciális funkcionális egysége a kalap, melynek fő feladata a szexuális spórák létrehozása, védelme, valamint terjesztése. Ennek megjelenése az evolúció során adaptív előnyt jelentett a többi, kalappal nem rendelkező gomba taxonnal szemben. A csoportunk korábban *C. cinerea* modell organizmusban azonosított egy DNS-kötő doménnel rendelkező transzkripciós faktort (142396), melynek kifejeződése magasabb volt a kalapban, mint más szövetekben, így feltételezhető, hogy szerepet játszik a kalap differenciálódásában. Tudományos Diákköri munkám céljául tűztük ki az alábbiakat:

1. Az 142396 azonosítójú génre nézve deléciós törzs létrehozását *C. cinerea*-ban, mely magába foglalja:
 - az 142396 azonosítójú gén *in vitro* összeszerelt RNP alapú CRISPR/Cas9 rendszerrel történő kiütését;
 - a tiszta vonalú deléciós törzs szelektálását oidiálási eljárással.
2. Az izolált deléciós mutánsok fenotípus vizsgálatát a vad típusú és mutáns törzsek termőtestjeinek összehasonlításával.

3. Anyagok és módszerek

A felhasznált vegyszerek és oldószerek a Sigma-Aldrich Kft-től (Merck Kft., Magyarország), a Molar Chemicals Kft-től (Magyarország) és a Biolab Zrt-től (Magyarország) kerültek beszerzésre. Az egyes lépések elvégzése során Eppendorf (Németország) kísérleti eszközöket alkalmaztunk.

3.1 Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

3.1.1. Baktérium tenyésztéshez használt táptalajok és tápoldatok

LB táptalaj/tápoldat (Luria-Bertani): 1 m/V% tripton, 0,2 m/V% élesztő kivonat, 1 m/V% NaCl. Szilárd táptalajhoz a tápoldatot 2 m/V% agarral egészítettük ki.

3.1.2. A *C. cinerea* tenyésztéséhez felhasznált táptalajok és tápoldatok

YMG táptalaj/tápoldat (Élesztőkivonat-Maláta-Glükóz, Yeast extract-Malt extract-Glucose): 0,4 m/V% élesztő kivonat, 1 m/V% maláta kivonat, 0,4 m/V% glükóz. Szilárd táptalajhoz a tápoldatot 1 m/V% agarral egészítettük ki.

CMM (Coprinospis Minimális Táptalaj/Tápoldat, Coprinospis Minimal Medium): 0,2 m/V% L-aszparagin, 1 m/V% glükóz, 2,5 V/V% Stock A, 0,1 V/V% Stock B, 1 V/V% Stock C. Szilárd táptalajhoz a tápoldatot 1 m/V% agarral egészítettük ki.

Stock A: 4 m/V% KH_2PO_4 , 9 m/V% Na_2HPO_4 , 1,16 m/V% Na_2SO_4 , 2 m/V% di-ammónium-tartarát. Az oldatot desztillált vízzel hígítottuk 500 ml végtérfogatra.

Stock B: 4 m/V% tiamin, melyet desztillált vízzel 500 ml végtérfogatra hígítottunk.

Stock C: 2,5 m/V% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, melyet desztillált vízzel 500 ml végtérfogatra hígítottunk.

RegMed (Regeneráció Táptalaj/Tápoldat, Regeneration Medium): 0,2 m/V% L-aszparagin, 17,2 m/V% szacharóz, 0,5 m/V% keményítő, 0,4 m/V% glükóz, 2,5 V/V% Stock A, 0,1 V/V% Stock B, 1 V/V% Stock C. Szilárd táptalajhoz a tápoldatot 1 m/V% agarral egészítettük ki, fedőagar esetében 0,7 m/V% agart. Szelektív táptalaj esetén a táptalajt 100 µg/ml hygromycinnel egészítettük ki.

3.2. Oldatok és reagensek

3.2.1 Gibson Assembly során használt oldatok

NEBuilder HiFi Assembly Master mix (New England Biolabs, USA).

SOC tápoldat (Glükózzal kiegészített gazdag tápoldat, Super Optimal broth with Catabolite repression): 2 m/V% tripton, 0,5 m/V% élesztő kivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 és 20 mM glükóz desztillált vízzel 1 l végérfogatban.

3.2.2. PCR során használt oldatok

Phusion PCR Master mix: 7,5 µl Thermo Scientific™ (USA) Phusion U Green Multiplex PCR Master Mix, 6 µl desztillált víz, 0,5 µl forward indítószekvenciát tartalmazó oldat, 0,5 µl reverz indítószekvenciát tartalmazó oldat és 0,5 µl DNS 15 µl végtérfogatban.

3.2.3. Agaróz gélelektroforézis során használt oldatok

1x TAE puffer (Trisz-Acetát-EDTA): 0,5 m/V% Trisz-(hidroximetil)-amino-metán, 0,04 m/V% EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), 0,1 V/V% ecetsav. A puffert desztillált vízzel egészítettük ki 1 liter végtérfogatra.

3.2.4. *C. cinerea* traszformáció során használt oldatok

MM puffer (Mannit-Na-Maleát, Mannitol-Na-Maleate): 2:1:1 arányban 1M mannitol, 0,2M Na-maleát (pH=5,5) és desztillált víz.

MMC puffer (Mannit-Na-Maleát-CaCl₂, Mannitol-Na-Maleate-CaCl₂): 1:0.5:0.05:0.45 arányban 1M mannitol, 0,2M Na-maleát (pH=5,5), 1M CaCl₂ oldat és desztillált víz.

Cas9 puffer: 2 ml 1M HEPES, 1ml MgCl₂, 50 µl ditiotreitolt 5 ml 3M KCl, RNáz mentes vízzel 10 ml-re kiegészítve.

PEG/CaCl₂ oldat (Polietilén-glikol/CaCl₂): 25 m/V% PEG 4000, 0,4 V/V% 1M Tris-HCl (pH=7,5), 2,5 V/V% 1M CaCl₂.

Protoplasztáló elegy: 50 µl Megazyme Protoplast F-t és 500 µl Novozymes® VintoTaste® Pro-t 550 µl MM pufferben oldva.

3.3. Alkalmazott indítószekvenciák

3.3.1 Transzformációs vektor fragmentumok felszaporításához használt indítószekvenciák

Hyg_FP: 5'-TGAACCGCCTTCAAAGTTATTTACTCATTCATTTAAACGGCTTCACGG-3' (T_m: 68 °C)

Hyg_RP: 5'-GAAAGGTAGAAGCTACCT-3' (T_m: 70 °C)

DHA_FP: 5'-AGAGATGAATATTGTCTAGACAGTGACCTGGACCTGATGG-3' (T_m: 66 °C)

DHA_RP: 5'-GATGCGAGAGGAGGAACGGTC-3' (T_m: 61 °C)

UHA_FP: 5'-CATCCGGCTCGTACAATTATGTACT-3' (T_m: 58 °C)

UHA_RP: 5'-GGTACTTGGCGGAAGTTTCAATAAATGAGTAAGTAAATTTGCC-3' (T_m: 64 °C)

3.3.2 Génkiütés vizsgálatának PCR ellenőrzéséhez alkalmazott indítószekvenciák

UHA: 5'- CATCCGGCTCGTACAATTATGTACT -3' (T_m: 58 °C)

DHA: 5'- GATGCGAGAGGAGGAACGGTC -3' (T_m: 61 °C)

Dig1_FP: 5'- CCGATCCAGTCAGTTCCCGAAA -3' (T_m: 58 °C)

Dig1_RP: 5'- GGCTTTTGGTCAGTGATGCGTG -3' (T_m: 60 °C)

Dig2_FP: 5'- TCATACAGTCCCAACCCGAACC -3' (T_m: 61 °C)

Dig2_RP: 5'- GCCGAGGTGTTGTAAGTAAGCC -3' (T_m: 60 °C)

gene_FP: 5'- ACATTGAACGCTGATGGAACC -3' (T_m: 58 °C)

gene_RP: 5'- GCAGCTTAAGGTACGTAGAC -3' (T_m: 56 °C)

3.4. Tenyésztési körülmények

3.4.1. Baktérium tenyésztési körülmények

Transzforomálás során az *Escherichia coli* NEB5α baktérium törzseket LB táptalajon 37 °C-on neveltük.

3.4.2 *C. cinerea* esetén alkalmazott tenyésztési körülmények

3.4.2.1 *C. cinerea* oidium-képzéshez alkalmazott tenyésztési körülmények

Az YMG táptalajon fenntartott *C. cinerea* törzset oidium termeléséhez YMG táptalajon növesztettük 37 °C-on növénynevelő kamrában állandó megvilágítás mellett.

3.4.2.2 *C. cinerea* termőtestképzés indukálásánál alkalmazott tenyésztési körülmények

A termőtestképzéshez a gombákat 1 m/V% glükózt tartalmazó YMG táptalajon növesztettük 4 napig (a telep a csésze szélét 1 cm-re közelítette meg) 37 °C-on sötétben, majd a termőtestek megjelenéséig 28 °C-os 12 óránként váltakozó sötét/világos inkubátorban neveltük.

3.4.2.3 A *C. cinerea* növekedési sebességének meghatározásánál alkalmazott tenyésztési körülmények

A növekedési sebesség meghatározásához 1 m/V% glükózt tartalmazó YMG táptalajon a *C. cinerea* törzsek felét 37 °C-on 4 napon át 24 órán keresztül sötét, illetve ezzel párhuzamosan, másik felét 37 °C-on 4 napon át 24 órán keresztül folyamatosan megvilágított inkubátorban neveltük.

3.5. Alkalmazott módszerek

3.5.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

3.5.1.1 A javítótemplát kazetta összeszereléséhez használt PCR reakciók

A javítótemplát kazettát alkotó fragmensek összeszereléséhez az egyes fragmenseket a következőképpen szaporítottuk fel:

Az *upstream* homológ kart *C. cinerea* genomi DNS-ről szaporítottuk fel az „UHA-fwd” és „UHA-rev” indítószekvenciák segítségével. A reakciókörülmények a következők voltak:

1. 98 °C – 2p; 2. 98 °C – 10mp; 3. 65 °C – 30mp; 4. 72 °C – 3p → 2. lépés 34x; 5. 72 °C – 10p

A *downstream* homológ kart *C. cinerea* genomi DNS-ről amplifikáltuk fel a „Dig1-fwd” és „Dig1-rev” indítószekvenciák segítségével. A reakciókörülmények a következők voltak:

1. 98 °C – 2p; 2. 98 °C – 10mp; 3. 65 °C – 30mp; 4. 72 °C – 3p → 2. lépés 34x; 5. 72 °C – 10p

A hygromycin rezisztenciát kódoló *hph* gént a „Hyg_FP” és „Hyg_RP” indítószekvenciák segítségével szaporítottuk fel. A reakciókörülmények a következők voltak:

1. 98 °C – 2p; 2. 98 °C – 10mp; 3. 65 °C – 30mp; 4. 72 °C – 3p → 2. lépés 34x 5. 72 °C – 10p

A transzformációt követően izolált hygromycin rezisztens törzsek PCR ellenőrzését a „Dig1”, „Dig2”, „UHA/DHA” és „*gene*” indítószekvencia párokkal végeztük el. A reakciókörülmények a következők voltak:

1. 98 °C – 2p; 2. 98 °C – 10mp; 3. 69 °C – 30mp; 4. 72 °C – 2p → 2. lépés 34x; 5. 72 °C – 5p

Az oidiálást követően megjelenő törzsekből Bastian Dörnte és Ursula Kües nyomán mikrohullámú sütőt alkalmazó protokoll (Dörnte és Kües, 2013) segítségével kivont és a mutáns fenotípusú gombákból vett DNS minták PCR ellenőrzését a Dig1, Dig2, UHA/DHA és *gene* indítószekvencia párokkal végeztük el. A reakciókörülmények a következők voltak:

1. 98 °C – 2p; 2. 98 °C – 10mp; 3. 69 °C – 30mp; 4. 72 °C – 3p → 2. lépés 34x; 5. 72 °C – 5p

3.5.2 PCR fragmentek tisztítása

A PCR fragmentek tisztítását a Macherey-NagelTM NucleospinTM Gel and PCR Clean-up Kit-el a gyártó által javasolt protokoll segítségével végeztük el.

3.5.3. Gibson összeszerelés

A Gibson összeszereléshez (assembly) a tisztított fragmenseket egyenlő moláris arányban összekevertük 5 µl végtérfogatban 5 µl Gibson Master Mix-szel és egy órán át 50 °C-on inkubáltuk.

3.5.4. Baktérium transzformáció

A Gibson reakció 4 µl-ét kompetens *E. coli* NEB5α sejtekbe juttattuk és 30 percen át jégen inkubáltuk. Ezt követően 30 másodpercig 42 °C-on hősokkoltuk a sejteket, majd 2 percig újra jégen inkubáltuk. Az inkubációt követően 950 µl SOC tápoldat hozzáadása után 1 órán át 37 °C-on regeneráltuk a sejteket, majd 100 µg/ml ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettük 100 µl végtérfogatban.

3.5.5 Plazmid minipreparátum készítése (MINIprep, 50 µl-es végtérfogatban)

A plazmid minipreparátum készítését LB tápoldatban tenyésztett *E. coli* NEB5α baktériumokból Macherey-Nagel™ Nucleospin Plasmid QuickPure™ Kit-tel, a gyártó által javasolt protokollt követve végeztük el.

3.5.6 A plazmidok nagy mennyiségben történő tisztítása (MIDIprep, 200 µl végtérfogatban)

A plazmid nagy mennyiségben történő tisztítását a Macherey-Nagel™ NucleoBond™ Xtra Midi Plus EF Kit-tel a gyártó által javasolt protokollt követve végeztük el.

3.5.7. Ribonukleoprotein tervezése és komplex összeszerelése

A gRNS-eket az sgRNACas9 szoftver segítségével terveztük meg és az Integrated DNA Technologies Inc (USA) céggel szintetizáltattuk meg. A reakcióhoz 1,2 µl crRNS, 1,2 µl tracrRNS és 9,6 µl nukleáz mentes duplex puffert mértünk össze PCR csövekbe, amiket először 95 °C-on, majd 5 percig 25 °C-on inkubáltunk. Ezt követően 0,5 µl tisztított Cas9 enzimet (Integrated DNA Technologies Inc., USA), 1,5 µl Cas9 és 1µl duplex puffert (Integrated DNA Technologies Inc., USA) adtunk a reakcióhoz. A fehérje-RNS komplex összeszereléséhez a reakciót 37 °C-on inkubáltuk 15 percig.

3.5.8 *C. cinerea* transzformálása

A *C. cinerea* transzformálását protoplasztált oidiumokon végeztük el. Ehhez 10 ml steril desztillált vizet pipettáztunk az az oidiumoztatott *C. cinerea* tenyészetekre, amikről steril spatulával, kapargatással gyűjtöttünk oidiumokat. Ezt 40 µm-es Avantor (USA) sejtiszűrőn keresztül 50 ml-es Falcon csőbe pipettáztuk, majd 10 percig 2400 x g sebességgel, 25 °C-on centrifugáltuk. A sejteket 5 ml MM pufferben szuszpendáltuk fel, majd megismételtük az előző centrifugási eljárást. A sejteket ezután protoplasztáló elegyben protoplasztáltuk 37 °C-on 950 x g sebességgel rázatva.

A protoplasztokat ezt követően 10 percen keresztül 640 x g sebességgel centrifugáltuk, majd a felülúszó eltávolítása után a sejteket 5 ml MMC pufferrel szuszpendáltuk fel. Megismételtük a centrifugálást, majd az így átmosott protoplasztokat 200 µl MMC pufferben szuszpendáltuk. Ezután 100 µl protoplaszthoz hozzáadtuk az összeszerelt RNP komplexet, 25 µl PEG/CaCl₂ oldatot, és 10 µg javító templát DNS-t, majd 30 percig jégen inkubáltuk a reakciót. Ezt követően 500 µl PEG/CaCl₂ oldatot adtunk az elegyhez és 25 °C hőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. az inkubálás után 20 ml MMC puffert adtunk a mintákhoz, amiket aztán 1100 g sebességgel 10 percen keresztül 25 °C-on centrifugáltunk. A felülúszót eltávolítottuk és a sejteket 3 ml MMC pufferben szuszpendáltuk. A reakciót végül 600 µl-es aliquotokban szétosztva RegMed táptalajra szélesztettük, melyekre másnap 400 µg/ml hygromycint tartalmazó fedőagart szélesztettünk.

3.5.9. DNS kivonás

3.5.9.1. DNS kivonás mikrohullámú sütővel

Az 1,5 ml térfogatú Eppendorf csövekbe 100 µl desztillált vizet pipettáztunk, majd sterilizált fogpiszkálóval egy 2x2 mm-es micélium darabot mostunk bele. Ezt követően mikrohullámú sütőben 1 percig 600 Watt-on kezeltük a mintákat, majd vortexelés után 30 másodpercig szobahőn inkubáltuk őket. Ezt követően 1 percig újra mikrohullámú sütőben melegítettük a mintákat 600 Watt-on, majd 10 percre -20 °C-ra helyeztük az Eppendorf csöveket. Ezt követően 9300 g sebességgel 5 percen keresztül, 25 °C-on centrifugáltuk a csöveket.

3.5.9.2 Nagy tisztaságú genomi DNS kivonás

Nagy tisztaságú DNS kivonásához a NucleoSpin® Plant II DNS izolációs készletet és a gyártó által javasolt protokollt alkalmaztuk.

3.5.10 RNS kivonás

Az RNS kivonáshoz a Zymo Research *Quick-RNA*™ MiniPrep készletet alkalmaztuk és a gyártó által javasolt protokollt követtük.

3.5.11 cDNS szintézise

A cDNS szintézisét a mutáns törzsekből kivont templát mRNS-ről készítettük reverz transzkripcióval a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)

segítségével, a gyártó által javasolt protokoll alapján. Az expresszió vizsgálatát RT-PCR segítségével végeztük el.

3.5.12 Tiszta genotípusú *C. cinerea* mutáns törzsek izolálása

A tiszta genotípusú mutánsok izolálásához a transzformálásnál alkalmazott módszerrel megegyezően gyűjtöttünk oidiumot a transzformáns törzsekből, amiket a 0,1 V/V% Tween-20 oldatban szuszpendáltunk fel. Majd 100 µl, 500 oidium/ml koncentrációjú szuszpenziót hygromycines YMG táptalajra szélesztettük. A megjelenő kolóniákat külön táptalajra helyeztük és PCR-rel vizsgáltuk a genotípust.

3.5.13 *C. cinerea* fenotípusának vizsgálata

3.5.13.1 Mikroszkópos vizsgálatok

3.5.13.1.1 Fénymikroszkópos vizsgálatok

A fiatal, még nem autolizáló kalap lemezeiből mintát vettünk és Leica DM 2500 LED (Leica, Németország) fénymikroszkóppal 40x, 100x, 200x és 400x nagyításokkal vizsgáltuk.

3.5.13.2 Micélium növekedési sebességének vizsgálata

A micélium növekedési sebességének vizsgálatához két mutáns és a vad típusú törzseket a két eltérő fényviszony (24 órán keresztül sötét/megvilágított) mellett YMG és ½ glükózos YMG táptalajokon neveltük. Négy napon keresztül, minden 24. órában, minimum három párhuzamos törzs mérését végeztük el és a különbségek szignifikanciáját Student's t-teszt segítségével vizsgáltuk GraphPad Prism szoftver (<https://www.graphpad.com/>) segítségével.

3.5.14. Bioinformatikai vizsgálatok

A filogenetikai analízishez használt genomokat a JGI Mycocosm portálról (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) töltöttük le. A szekvenciahasonlósági keresést mmseqs *allvs.all* kereséssel végeztük el. A fehérjecsáládokat az MCL clustering algoritmus (<http://micans.org/mcl/>) segítségével rendeztük össze. A filogenetikai fa elkészítéséhez egykópiás ortocsoportokat használtunk. Ezek aminosavszekvenciáit a Mafft szekvenciaillesztő programmal (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) illesztettük egymáshoz. Az illesztékeket ezután a Trimal szoftverrel (<http://trimal.cgenomics.org/>) szerkesztettük. A szerkesztett illesztékek és FastTree szoftver (<https://bio.tools/fasttree>) segítségével készítettük a filogenetikai fát. A *whc1* transzkripció faktor meglétet/hiányát a

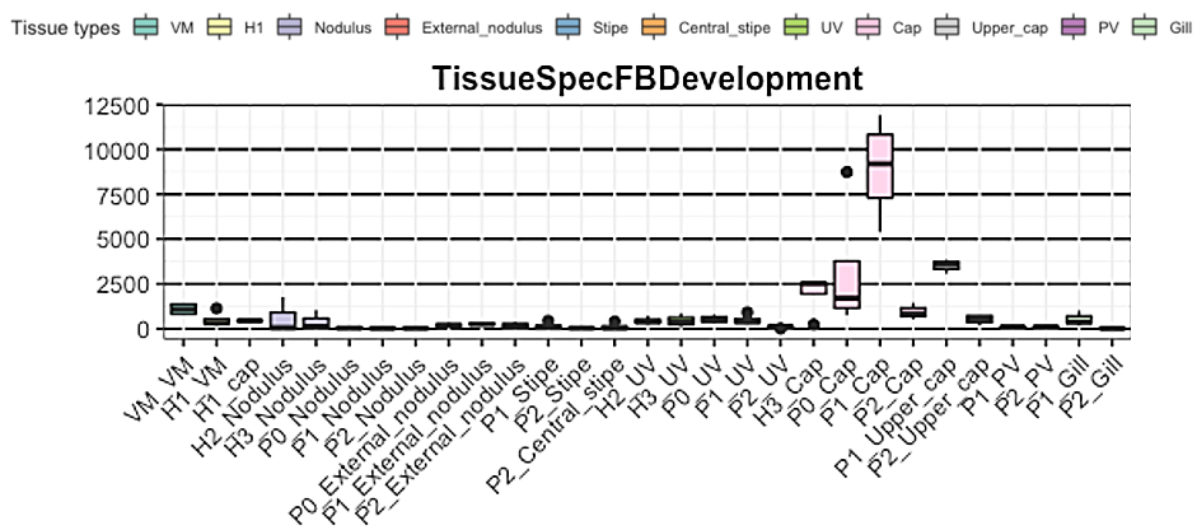
Phy3D szoftverrel (<https://phyd3.bits.vib.be/>) vizualizáltuk. A fent említett lépéseket az R szoftver (<https://www.r-project.org/>) segítségével végeztük el.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1 Kalapspecifikus transzkripció faktorok azonosítása

4.1.1. Az 142396 azonosítójú transzkripció faktor azonosítása

A kalap differenciálódását egy konzervált génregulációs hálózat szabályozza, melynek szabályozási mechanizmusairól kevés információ áll rendelkezésünkre. Korábban bioinformatikai eszközökkel olyan konzervált transzkripció faktorokat azonosítottunk, melyek magas transzkripció szintet mutattak a kalapban. Ezen transzkripció faktorok közül, Krizsán és munkatársai 2019-ben leírt (Krizsán és mtsai., 2019) eredményei, valamint Varga 2020-ban megjelent doktori értekezése alapján (Varga, 2020) vizsgálatunk célpontjául az 142396 azonosítójú transzkripció faktort választottuk (2. ábra).



2. ábra: Az 142396 fehérjeazonosítójú gén kifejeződése *C. cinerea* 'szöveteiben' a vegetatív micélium, hifacsomók és a primordiális állapotok során (Varga, 2020). A kalap szöveteiben mért transzkripció szintet rózsaszínnel jelöltük.

4.1.2 Az 142396 azonosítójú transzkripció faktor *in silico* jellemzése

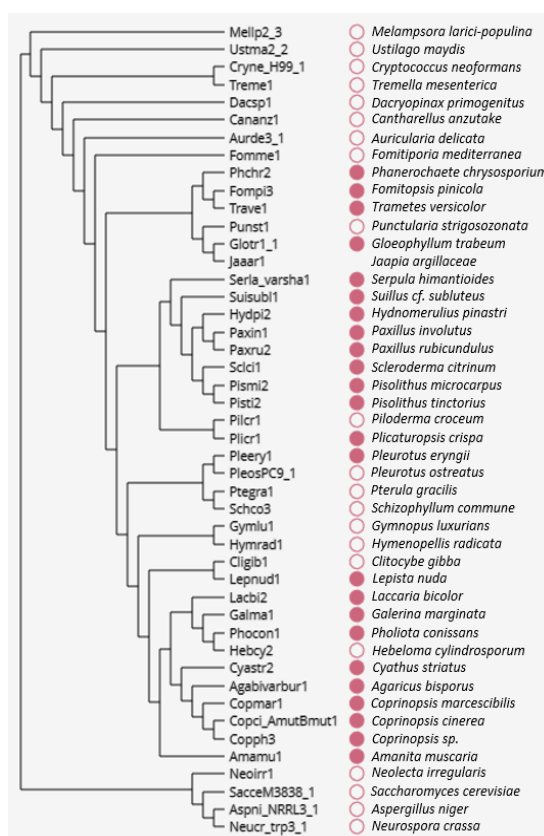
4.1.2.1. Az 142396 azonosítójú transzkripció faktor doménösszetétele

A vizsgált transzkripció faktor egy 1669 aminosav hosszúságú, 52.09 kDa tömegű fehérje, ami egy sejtmagi lokalizációs szignállal és egy HMG-box doménnel rendelkezik. A domén számos funkcióhoz köthető, a gombák esetében például specifikus szexuális- és aszexuális fejlődési utak és anyagcserepályák szabályozásával van kapcsolatban (Ait Benkhali és mtsai. 2013; Bokor és mtsai. 2019; Stros és mtsai., 2007), de megtalálható SOX transzkripció faktorokban is, melyek az eukarióta sejtek differenciációjában játszanak szerepet

(Zhang és Hou, 2021). Megemlítendő, hogy a termőtestképzésben szerepet játszó *F. velutipes* PDD1, a *C. cinerea* PCC1 és EXP1 faktorok szintén HMG-box doménnel rendelkeznek (Wu és mtsai., 2019).

4.1.2.2 A 142396 azonosítójú transzkripció faktor filogenetikai analízise

A filogenetikai analízishez komplexebb szerveződésű, kalappal rendelkező bazídiumos gombák, egyszerűbb reszupinátusképző bazídiumos gombák, bazídiumos és aszkuszos élesztők, valamint növénypatogén fonalas gombák genomját gyűjtöttük össze és vizsgáltuk a 142396 azonosítójú transzkripció faktor jelenlétét (**3. ábra**). A 142396 jelű transzkripció faktor ortológjai az *Agaricales*, *Polyporales* és *Boletales* rendekben találhatók meg, ahol számos kalappal rendelkező gomba szerepel. Ugyanakkor nincs jelen a korán elágazó bazídiumos gombákban, sem a *Cantharellales* rendben, mely utóbbi már rendelkezik kalappal.



3. ábra: A 46 kiválasztott gombafaj *in silico* módszerekkel létrehozott filogenetikai rendszere. A kiválasztott fajok JGI Mycocosm azonosítóit az ábra jobb oldali, oszlopában tüntettük fel a megfelelő fajnevekkel együtt és jelöltük a leszármazási kapcsolatokat. A piros színű telített körök az 142396 azonosítójú transzkripció faktor ortológjainak jelenlétét, az üres körök annak hiányát jelzik.

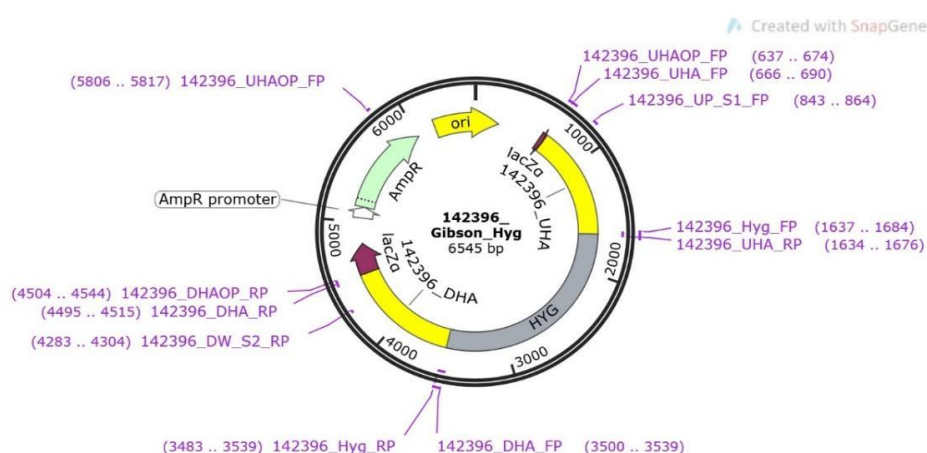
4.1.3 Az 142396 azonosítójú transzkripció faktor deléciója

4.1.3.1 Deléciós kazetta megtervezése és összeszerelése

A transzkripció faktor kiütéséhez deléciós kazettát terveztünk a SnapGene szoftver segítségével (4. ábra).

Ezt összesen 4 fragmensből állítottuk elő. A plazmidba hygromycin rezisztencia gént építettünk be, hogy a későbbiekben, a transzformáció során ellenőrizni tudjuk a plazmid bizonyos részeinek genomba épülését. A további három elem a pUC19 plazmid töredék és a gént közrefogó homológ karok voltak.

A vektor fragmentumait PCR reakcióval szaporítottuk fel, majd a Gibson Assembly protokollt követve szereltük össze.



3. **ábra:** A hygromycin rezisztenciában szerepet játszó gént tartalmazó vektor felépítése (SnapGene szoftver). Lila betűszínnel a fragmentumokhoz kapcsolódó indítószekvenciákat jelöltük.

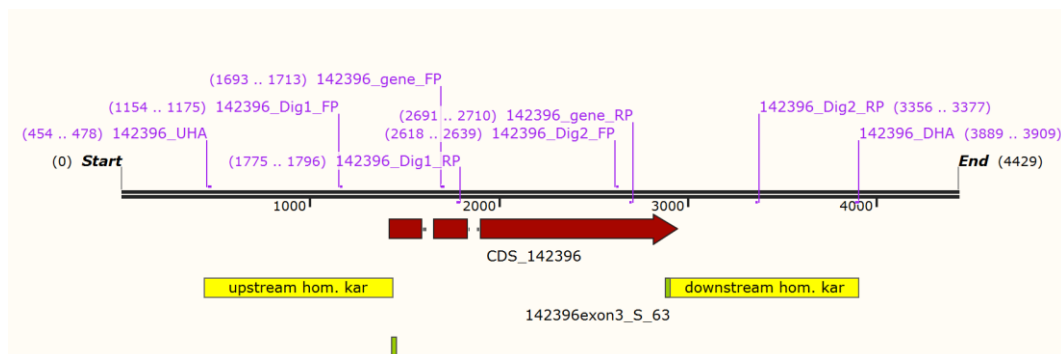
4.1.3.2. 142396 azonosítójú transzkripció faktor deléciója *C. cinerea*-ban

4.1.3.2.1 Transzformációs hatékonyság

A vizsgálandó gént az Anyagok és módszerek szakaszban tárgyaltak alapján üttöttük ki. Ennek eredményeként 11 transzformáns telepet kaptunk $\sim 10^7$ protoplaszt transzformálásával. Egyéb fajoknál (például *S. cerevisiae*) tapasztalt adatokkal összehasonlítva a folyamat transzformációs hatékonysága igen alacsony (Kawai és mtsai., 2010). Ez azonban általános a bazídiumos gombák esetében, számos alcsoportra jellemző egyedi tulajdonság (pl. sejtfalösszetétel, egyes DNS javítómechanizmusok aktivitása és inaktivitása). Ezek a tényezők jelentősen lecsökkentik a sikeres, tervezett genom módosításokat a bazídiumos gombák körében (Honda és mtsai., 2019).

4.1.3.2.2 A deléción ellenőrzése

SnapGene segítségével a génhez és a gén upstream, illetve downstream szegmenseire indítószekvencia párokat terveztünk (**5. ábra**). A transzformálás eredményeként kapott törzsekben a transzkripció faktor deléciónját PCR reakcióval, a Dig1, Dig2, UHA/DHA és *gene* indítószekvenciákkal ellenőriztük (**6. ábra**). A PCR vizsgálatok alapján két deléción törzset sikerült előállítanunk (#1; #6).



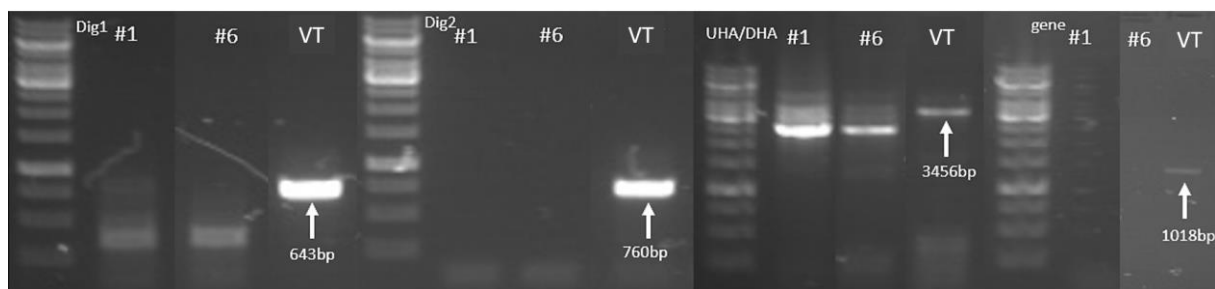
4. **ábra:** Az ellenőrző indítószekvencia párok elhelyezkedése. A vizsgálataink során a Dig1, Dig2, UHA/DHA és *gene* indítószekvencia párokat használtuk.



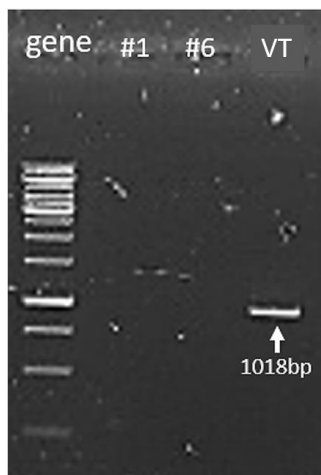
6. **ábra:** A transzformációt követő PCR vizsgálatok gélelektroforézis futásai. A fragmensek nagyságát kalibrációs oldattal határoztuk meg. A sikeres kivágódásra utaló eredményeket az #1 és #6 törzsek esetében kaptunk. Molekulasúly marker: GeneRuler (1kb DNA ladder, Thermo Scientific).

4.1.3.2.3 Deléció vizsgálata a fenotipizálás során

Az #1 és #6 transzformáns törzsekből oidiumoztatással tiszta deléciós típusú monokarionos törzseket állítottunk elő, melyeket a fent leírtakkal megegyező módon ellenőriztünk (7. ábra). A mutáns törzseknél ellenőriztük a gén kifejeződését úgy, hogy a deléciós törzsekből izolált RNS-ről cDNS-t szintetizáltunk reverz transzkriptázzal és erről a *gene* indítószekvencia-pár segítségével próbáltuk meg sokszorozítani a transzkripció faktorunkat kódoló DNS szakaszt (8. ábra).



7. ábra: A mutáns fenotípusú gombák micéliumából vett DNS minta PCR ellenőrzésének gél elektroforézises képe. Molekulasúly marker: GeneRuler (1kb DNA ladder, Thermo Scientific).



8. ábra: Az mRNS-ről szintetizált cDNS PCR ellenőrzésének gél elektroforézises képe. Molekulasúly marker: GeneRuler (1kb DNA ladder, Thermo Scientific).

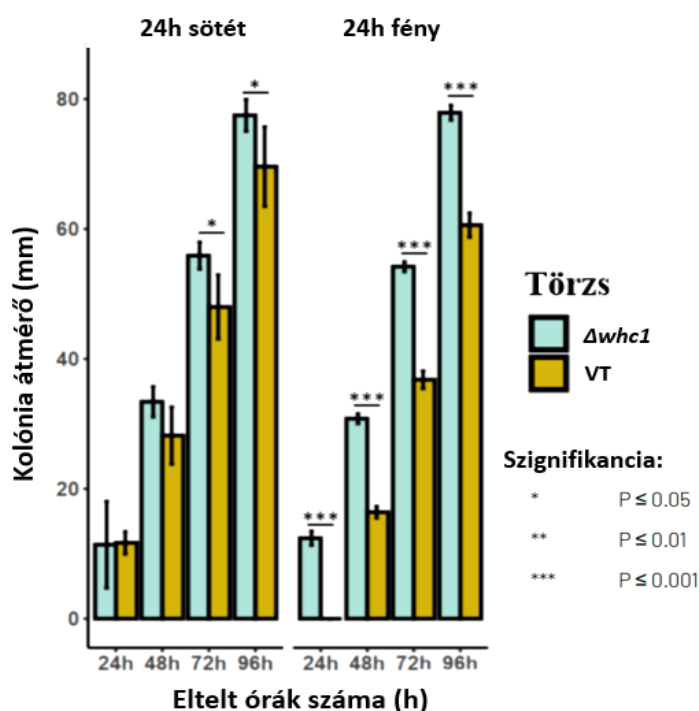
4.2 Az 142396 transzkripció faktor deléciós törzs jellemzése

4.2.1 A deléciós törzs növekedési sebessége

A létrehozott deléciós törzs jellemzése során megvizsgáltuk az egyes törzsek életképességét esetlegesen érintő változásokat. Kísérleteinkben elsőként YMG táptalajon

teszteltük a mutáns törzs növekedését. A vizsgálatok során a csészék felét 37 °C-os, 24 órán keresztül sötét, másik felét 37 °C-os, 24 órán keresztül megvilágított inkubátorba helyeztük. A telepek átmérőjét 5 párhuzamos mintavétellel az átoltástól számított minden 24. órában megmértük, 96 órán keresztül (**9. ábra**).

A sötétben, valamint fényben történő inkubáció során a deléciós törzs növekedési sebessége majdnem minden esetben nagyobb volt a vad típusúénál. A mutáns, valamint a vad típus növekedése közti eltérés a fény jelenlétében jelentősebbnek bizonyult, mint a sötétben történő inkubáció esetén. Sajnos a hifás növekedés gyorsulása és a termőtestképzés közötti kapcsolat magyarázatára igen kevés adat áll rendelkezésre, ezért a folyamat megfejtése még további vizsgálatokat igényel.

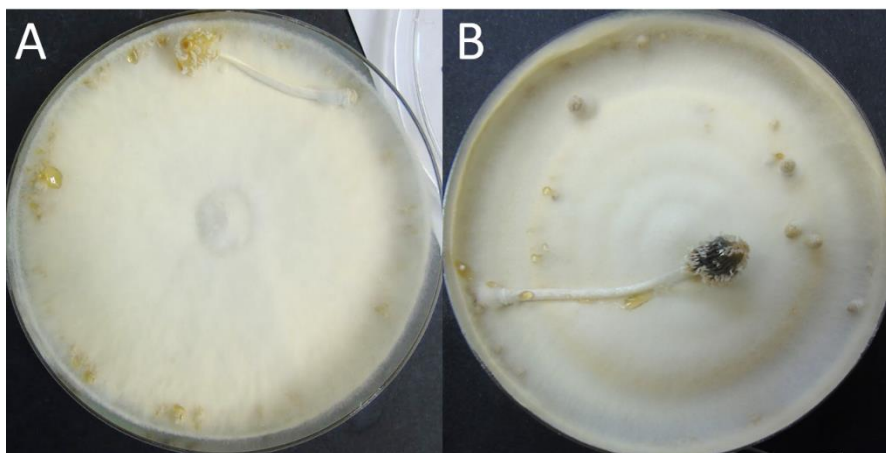


9. ábra: A micéliumok növekedési adataiból készített oszlopdiagramm. A kategóriákat az inkubálás során alkalmazott fénymennyiség, illetve a táptalajok glükóztartalma alapján különítettük el. A statisztikai értékelést a Student's t-teszt segítségével végeztük el, a vad típusú törzshöz viszonyítva, ahol *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$ és ***: $p \leq 0,001$.

4.2.2 A deléciós törzs termőtestjeinek vizsgálata

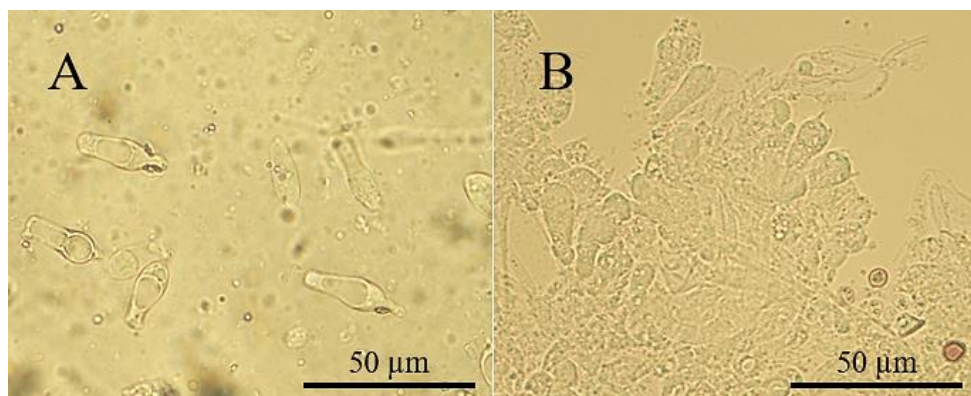
Mivel a kiválasztott transzkripciós faktor az *in silico* vizsgálatok során alapján elsősorban a kalapban fejeződik ki, a gombákon termőtesteket képeztettünk és megvizsgáltuk a kalap fenotípusát. A tiszta genotípusú deléciós törzsek kalapja a vad típusú egyedekétől - ahol ez a képlet fekete - eltérően fehér színű volt (**10. ábra**). A lemezek további vizsgálatának

függvényében valószínűsíthető, hogy a pigmentáció hiánya a sporulációs defektusra vezethető vissza. Ezt támasztja alá a Lu és mtsai. által végzett kísérletsorozat, ahol 3 törzs esetében a meiózis, 1 törzs esetében pedig a sterigmák képzésének folyamatában következett be defektus. Mindegyik esetben elmaradt a spóráképzés, ami a kalap fehér színében nyilvánult meg (Lu és mtsai., 2003).



10. ábra: *C. cinerea* WHC deléciós (A) és vad típusú (B) törzsek termőtestjei. A két termőtest morfológiailag csak a kalap színében tér el. A vad típusú törzs fekete kalapjától eltérően a mutáns kalapja fehér színű.

A lemezekből készített minták fénymikroszkópos vizsgálata során eltéréseket tapasztaltunk a bazídiumsejtek morfológiájában is. A vad típusú sejteken négy csúcsos sterigma látható. A deléciós mutánsok esetében ez a képlet sok esetben redukálódott. A vad típusú bazídiumsejtek mellett nagy számban jelentek meg a négy helyett csupán egy, kidudorodó sterigmával rendelkező sejtek. A mikroszkópos vizsgálat során a spórák számában is igen jelentős különbség mutatkozott: a mutáns törzsek esetében ezek csak nagyon kis mennyiségben, vagy a vizsgált körülmények között egyáltalán nem voltak jelen (11. ábra).



11. ábra: *C. cinerea* deléciós mutáns (A) és vad típusú (B) termőtest lemezéből készült preparátumok fénymikroszkópos felvétele. A mutáns esetében egy darab, felfújódott sterigma látható, a spórák hiányoztak. A vad típusú törzsnél 4 csúcsos sterigma látható.

Az általunk vizsgált transzkripciós faktorhoz hasonlóan még számos gén befolyásolhatja különböző folyamatokon keresztül a kalap fenotípusát. Ilyen például a már korábban is említett, *C. cinerea*-ban megtalálható gén, a *cag1*, amelynek mutációja során megkezdődik a tönk és a kalap differenciálódása, a lemezek fejlődése azonban gátolt (Masuda és mtsai., 2016). Bizonyos feltételezések szerint mind a gén, mind pedig a paralógja a *Cc.tupA*, egy nagymértékben konzervált differenciációs útvonal tagjai. Az ismereteink ezzel kapcsolatban még rendkívül hiányosak, azonban Masuda és munkatársai (2016) által végzett kutatás kimutatta, hogy mindkét gén nagy mértékben expresszálódott fejlődő lemezekben.

Szintén a fejlődő lemezekben, főként a himenofórában fejeződnek ki *L. edodes*-ben a MAP kinázt kódoló *Le.MAPK* és interakciós partnere, a *Le.DRMIP* (Szeto és mtsai., 2007), ezért a hatásuk a *C. cinerea tupA*-hoz hasonlíthat. Hasonló funkcióval bír a fentebb tárgyalt, *C. neoformans* esetében megtalálható *pum1* gén is, melynek fontos szerepe van a sporulációban és a bazídium differenciálódásában (Wang és mtsai., 2014). Homológjainak egy *F. filiformis* törzsben magas volt az expressziós szintje a kalapban (Liu és mtsai., 2020).

Bizonyos, a spóráképzésben módosított gombák nem csak tudományos, de gazdasági és ipari szempontból is jelentősek (Murakami, 1993). Ilyen például a *Pleurotus ostreatus*, amely élelmezési szempontból jelentős kellemes íze, magas fehérje-, élelmi rost- és antioxidáns tartalma miatt. A nagy piaci kereslet következtében világszerte sok helyen termesztik nagyipari szinten. Azonban nagy károkat okozott a gomba rendkívüli mértékű spóratermelése, mely következtében a szellőzőrendszerek gyakran eltömődtek és a gombák kezelésével foglalkozó dolgozók körében légúti problémák jelentkeztek. A probléma megszüntetésére hozták létre az ATCC 58937 mutáns törzset, ahol a spóráképzés csak nagyon kis mértékű volt (Baars és mtsai.,

2000). Hasonló problémák más gombafajoknál is fellépnek, így az ilyen jellegű, spóramentes mutánsok létrehozása ipari szempontból is fontos molekuláris biológiai célkitűzés lehet.

5. Összefoglalás

A munkánk során deléciós törzseket hoztunk létre az 142396 azonosítójú génre nézve *C. cinerea* modellorganizmusban, fenntartottuk a tiszta vonalú mutánsokat majd a deléciós mutáns- és a vad törzs néhány jellemző fenotípusos tulajdonságait hasonlítottuk össze.

Eredményeink összefoglalásaként megállapítjuk, hogy:

1. Az 142396 fehérjeazonosítójú gén elrontása céljából deléciós kazettákat hoztunk létre, melyeket templát DNS-ként alkalmaztuk a CRISPR-Cas9 módszer során, ezzel létrehozva egy új *C. cinerea* mutáns törzset.
2. A vizsgált gén CRISPR-Cas9 rendszerrel végrehajtott specifikus génkiütésének sikerességét PCR, valamint RT-PCR segítségével validáltuk.
3. A vad típusú törzs és a tiszta vonalú deléciós mutáns törzs jellemzése során eltéréseket figyeltünk meg a növekedési sebesség intenzitásában, valamint a gomba morfológiai jellegeiben. Az általunk vizsgált gén hiányában a mutáns törzs gyorsabb növekedést mutatott a kontrollhoz képest. A fenotipizálással létrehozott termőtesteket szabad szemmel és mikroszkóposan vizsgáltuk, illetve a termőtestekből DNS kivonással kinyert DNS mintákat több indítószekvencia párral történő PCR reakciókkal ellenőriztük. Eredményeink alapján elmondható, hogy a vizsgált protein hiányában szignifikánsan kevesebb spóra képződött, mely egy a vad típustól eltérő fehér kalap megjelenését vonta maga után.

A deléciós *C. cinerea* mutáns törzs létrehozása kiemelkedő jelentőségű a gomba regulációs útvonalainak teljes megismeréséhez és így modell organizmusként való alkalmazásához. Mivel jelenleg korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésünkre a bazídiumos gombák szabályozási és differenciációs folyamatainak megértéséhez, az általunk vizsgált transzkripciós faktor hatásának teljeskörű vizsgálata útmutatást nyújthat ezen mechanizmusok általános működésének és evolúciós kialakulásának megismeréséhez.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőimnek, Dr. Nagy Lászlónak, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet tudományos főmunkatársának és Dr. Wu Honglinak, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet tudományos munkatársának szeretném megköszönni azt a rengeteg támogatást, segítséget és tanácsot, ami nélkül a dolgozatom nem jöhetett volna létre.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Virágh Máténak munkájáért, segítségéért és ötleteiért, melyekkel dolgozatom létrejöttét segítette.

Külön meg szeretném köszönni Dr. Merényi Zsoltnak a filogenetikai vizsgálatokban nyújtott segítségét és Dr. Szebenyi Csillának az értékes visszajelzéseket és javaslatokat.

7. Irodalomjegyzék

- Ajuh P, Kuster B, Panov K, Zomerdijs JC, Mann M, Lamond AI. Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J.* 2000, 19(23):6569-6581.
- Ait Benkhali J, Coppin E, Brun S, Peraza-Reyes L, Martin T, Dixelius C, Lazar N, van Tilbeurgh H, Debuchy R. A network of HMG-box transcription factors regulates sexual cycle in the fungus *Podospora anserina*. *PLoS Genet.* 2013, 9(7):e1003642.
- Ando Y, Nakazawa T, Oka K, Nakahori K, Kamada T. Cc.snf5, a gene encoding a putative component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, is essential for sexual development in the agaricomycete *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 2013, 50:82-89.
- Asgeirsdóttir SA, Halsall JR, Casselton LA. Expression of two closely linked hydrophobin genes of *Coprinus cinereus* is monokaryon-specific and down-regulated by the oid-1 mutation. *Fungal Genet. Biol.* 1997, 22(1):54-63.
- Baars J, Sonnenberg A, Mikosch T, Van Griensven L. Development of a sporeless strain of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. 2000.
- Binninger DM, Skrzynia C, Pukkila PJ, Casselton LA. DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *EMBO J.* 1987, 6(4):835-840.
- Burns C, Stajich JE, Rechtsteiner A, Casselton L, Hanlon SE, Wilke SK, Savytskyy OP, Gathman AC, Lilly WW, Lieb JD, Zolan ME, Pukkila PJ. Analysis of the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea* reveals conservation of the core meiotic expression program over half a billion years of evolution. *PLoS Genet.* 2010, 6(9):1001135.
- Bokor E, Ámon J, Keisham K, Karácsony Z, Vágvolgyi C, Hamari Z. HMGB proteins are required for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One.* 2019, 14(4):e0216094.
- Chia SZ, Lai YW, Yagoub D, Lev S, Hamey JJ, Pang CNI, Desmarini D, Chen Z, Djordjevic JT, Erce MA, Hart-Smith G, Wilkins MR. Knockout of the Hmt1p Arginine Methyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* Leads to the Dysregulation of Phosphate-associated Genes and Processes. *Mol. Cell. Proteomics.* 2018, 17(12):2462-2479.
- Dörnte B, Kües U. Fast Microwave-based DNA Extraction from Vegetative Mycelium and Fruiting Body Tissues of Agaricomycetes for PCR Amplification. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy.* 2013, 7:825-836.

- Eliás-Villalobos A, Fernández-Álvarez A, Ibeas JI. The general transcriptional repressor Tup1 is required for dimorphism and virulence in a fungal plant pathogen. *PLoS Pathog.* 2011, 7(9):e1002235.
- Geng F, Cao Y, Laurent BC. Essential roles of Snf5p in Snf-Swi chromatin remodeling in vivo. *Mol Cell Biol.* 2001, 21(13):4311-4320.
- Halbwachs H, Simmel J, Bässler C. (2016). Tales and mysteries of fungal fruiting: How morphological and physiological traits affect a pileate lifestyle. *Fungal Biology Reviews.* 2016, 30(2):36-61.
- Honda Y, Tanigawa E, Tsukihara T, Nguyen DX, Kawabe H, Sakatoku N, Watari J, Sato H, Yano S, Tachiki T, Irie T, Watanabe T, Watanabe T. Stable and transient transformation, and a promoter assay in the selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *AMB Express.* 2019, 9(1):92.
- Kamada T. Stipe Elongation in Fruit Bodies. In Wessels JGH, Meinhardt F (eds). *Growth, Differentiation and Sexuality. The Mycota vol 1.* 1994, p367-379. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioeng. Bugs.* 2010, 1(6):395-403.
- Kertesz-Chaloupková K, Walser PJ, Granado JD, Aebi M, Kües U. Blue Light Overrides Repression of Asexual Sporulation by Mating Type Genes in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Fungal Genet Biol.* 1998, 23(1):95-109.
- Kiefer JC. Back to basics: Sox genes. *Dev. Dyn.* 2007, 236(8):2356-2366.
- Krizsán K, Almási E, Merényi Z, Sahu N, Virágh M, Kószó T, Mondo SJ, Kiss B, Bálint B, Kües U, Barry K, Cseklye J, Hegedüs B, Henrissat B, Johnson J, Lipzen A, Ohm R, Nagy I, Pangilinan J, Nagy LG. Transcriptomic atlas of mushroom development reveals conserved genes behind complex multicellularity in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019, 116. 7409-7418.
- Kües U, Granado JD, Hermann R, Boulianne RP, Kertesz-Chaloupková K, Aebi M. The A mating type and blue light regulate all known differentiation processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol. Gen. Genet.* 1998, 260(1):81-91.
- Kües U. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64(2):316-353.
- Kües U, Subba S, Yu Y, Sen M, Khonsuntia W, Singhadaung W, Lange K, Lakkireddy K. Regulation of fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. In Baars JJP, Sonnenberg ASM (eds). *Science and cultivation*

- of edible fungi. *Proceedings of the XIXth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi*. 2016, p318-322. International Society of Mushroom Science, Amsterdam.
- Kües U, Navarro-González M, Srivilai P, Chaisanea W, Velagapudi R. Mushroom Biology and Genetics. In Kües U (ed.). *Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts*. 2007, p587-607. Universitätsverlag Göttingen, Göttingen.
- Lin J, Zhao Y, Ferraro AR, Yang E, Lewis ZA, Lin X. Transcription factor Znf2 coordinates with the chromatin remodeling SWI/SNF complex to regulate cryptococcal cellular differentiation. *Commun. Biol.* 2019, 2:412.
- Liu L, He GJ, Chen L, Zheng J, Chen Y, Shen L, Tian X, Li E, Yang E, Liao G, Wang L. Genetic basis for coordination of meiosis and sexual structure maturation in *Cryptococcus neoformans*. *Elife*. 2018, 7:e38683.
- Liu XB, Xia EH, Li M, Cui YY, Wang PM, Zhang JX, Xie BG, Xu JP, Yan JJ, Li J, Nagy LG, Yang ZL. Transcriptome data reveal conserved patterns of fruiting body development and response to heat stress in the mushroom-forming fungus *Flammulina filiformis*. *PLoS One*. 2020, 15(10):e0239890.
- Liu Y, Srivilai P, Loos S, Aebi M, Kües U. An essential gene for fruiting body initiation in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea* is homologous to bacterial cyclopropane fatty acid synthase genes. *Genetics*. 2006, 172(2):873-884.
- Lu BC, Gallo N, Kües U. White-cap mutants and meiotic apoptosis in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Fungal Genet. Biol.* 2003, 39(1):82-93.
- Masuda R, Iguchi N, Tukuta K, Nagoshi T, Kemuriyama K, Muraguchi H. The *Coprinopsis cinerea* Tup1 homologue Cag1 is required for gill formation during fruiting body morphogenesis. *Biol. Open*. 2016, 5(12):1844-1852.
- McKnight KH, McKnight VB: A Field Guide to Mushrooms: North America. In Peterson RT (ed.). *Inky Caps, Crumblecaps, and Mottlegills: Family Coprinaceae*. 1978, p 276-280. Houghton Mifflin, Boston, New York.
- Moore D. Tissue Formation. In Gow NAV, Gadd GM (eds). *The Growing Fungus*. 1994, p423-465. Chapman & Hall, London.
- Muraguchi H, Kamada T. The ich1 gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting. *Development*. 1998, 125(16):3133-3141.
- Muraguchi H, Takemaru T, Kamada T. Isolation and characterization of developmental variants in fruiting using a homokaryotic fruiting strain of *Coprinus cinereus*. *Mycoscience*. 1999, 40(3):227-233.

- Muraguchi H, Fujita T, Kishibe Y, Konno K, Ueda N, Nakahori K, Yanagi SO, Kamada T. The *exp1* gene essential for pileus expansion and autolysis of the inky cap mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) encodes an HMG protein. *Fungal Genet. Biol.* 2008, 45(6):890-896.
- Murakami S. Genetic and breeding of spore deficient strains in *Agrocybe cylindracea* and *Lentinus edodes*. In: Chang ST, Buswell JA, Chiu AW (eds.) *Mushroom biology and mushroom products*. 1993, p63–69. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Murata Y, Fujii M, Zolan ME, Kamada T. Molecular analysis of *pcc1*, a gene that leads to A-regulated sexual morphogenesis in *Coprinus cinereus*. *Genetics*. 1998, 149(4):1753-1761.
- Nakazawa T, Kaneko S, Miyazaki Y, Jojima T, Yamazaki T, Katsukawa S, Shishido K. Basidiomycete *Lentinula edodes* CDC5 and a novel interacting protein CIPB bind to a newly isolated target gene in an unusual manner. *Fungal Genet. Biol.* 2008, 45(6):818-828.
- Nakazawa T, Kaneko S, Murata H, Kamada T, Shishido K. The homologue of *Lentinula edodes* *ctg1*, a target for CDC5 and its interacting partner CIPB, from *Coprinopsis cinerea* is involved in fruiting-body morphogenesis of *C. cinerea*. *Mycoscience*. 2009, 50:331-342.
- Nakazawa T, Tatsuta Y, Fujita T, Nakahori K, Kamada T. Mutations in the *Cc.rmt1* gene encoding a putative protein arginine methyltransferase alter developmental programs in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Curr. Genet.* 2010, 56(4):361-367.
- Nakazawa T, Ando Y, Hata T, Nakahori K. A mutation in the *Cc.arp9* gene encoding a putative actin-related protein causes defects in fruiting initiation and asexual development in the agaricomycete *Coprinopsis cinerea*. *Curr. Genet.* 2016, 62(3):565-574.
- Nagy GL, Vágvolgyi C, Papp T. Morphological characterization of clades of the Psathyrellaceae (Agaricales) inferred from a multigene phylogeny. *Mycological Progress*. 2013, 12:505-517.
- Ohm RA, de Jong JF, de Bekker C, Wösten HA, Lugones LG. Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. *Mol. Microbiol.* 2011, 81(6):1433-1445.
- Peterson CL, Dingwall A, Scott MP. Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, 91(8):2905-2908.
- Pukkila PJ. *Coprinopsis cinerea*. *Curr. Biol.* 2011, 21(16):R616-617.
- Raper JR, Miles PG. The Genetics of *Schizophyllum Commune*. *Genetics*. 1958, 43(3):530-546.
- Redhead S, Vilgalys R, Moncalvo JM, Johnson J, Hopple J. *Coprinus* Pers. and the Disposition of *Coprinus* Species sensu lato. *Taxon*. 2001, 50:203.

- Shi TQ, Liu GN, Ji RY, Shi K, Song P, Ren LJ, Huang H, Ji XJ. CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101(20):7435-7443.
- Shioya T, Nakamura H, Ishii N, Takahashi N, Sakamoto Y, Ozaki N, Kobayashi M, Okano K, Kamada T, Muraguchi H. The *Coprinopsis cinerea* septin Cc.Cdc3 is involved in stipe cell elongation. *Fungal Genet. Biol.* 2013, 58-59:80-90.
- Swamy S, Uno I, Ishikawa T. (1984). Morphogenetic Effects of Mutations at the A and B Incompatibility Factors in *Coprinus cinereus*. *Microbiology.* 130:3219-3224.
- Stajich JE, Wilke SK, Ahrén D, Au CH, Birren BW, Borodovsky M, Burns C, Canbäck B, Casselton LA, Cheng CK, Deng J, Dietrich FS, Fargo DC, Farman ML, Gathman AC, Goldberg J, Guigó R, Hoegger PJ, Hooker JB, Huggins A, James TY, Kamada T, Kilaru S, Kodira C, Kües U, Kupfer D, Kwan HS, Lomsadze A, Li W, Lilly WW, Ma LJ, Mackey AJ, Manning G, Martin F, Muraguchi H, Natvig DO, Palmerini H, Ramesh MA, Rehmeier CJ, Roe BA, Shenoy N, Stanke M, Ter-Hovhannisyan V, Tunlid A, Velagapudi R, Vision TJ, Zeng Q, Zolan ME, Pukkila PJ. Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010, 107(26):11889-94.
- Szeto CY, Leung GS, Kwan HS. Le.MAPK and its interacting partner, Le.DRMIP, in fruiting body development in *Lentinula edodes*. *Gene.* 2007, 393(1-2):87-93.
- Terashima K, Yuki K, Muraguchi H, Akiyama M, Kamada T. The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics.* 2005, 171(1):101-108.
- Todd RB, Greenhalgh JR, Hynes MJ, Andrianopoulos A. TupA, the *Penicillium marneffei* Tup1p homologue, represses both yeast and spore development. *Mol. Microbiol.* 2003, 48(1):85-94.
- Varga T, Krizsán K, Földi C, Dima B, Sánchez-García M, Sánchez-Ramírez S, Szöllősi GJ, Szarkándi JG, Papp V, Albert L, Andreopoulos W, Angelini C, Antonín V, Barry KW, Bougher NL, Buchanan P, Buyck B, Bense V, Catcheside P, Chovatia M, Cooper J, Dämon W, Desjardin D, Finy P, Geml J, Haridas S, Hughes K, Justo A, Karasiński D, Kautmanova I, Kiss B, Kocsubé S, Kotiranta H, LaButti KM, Lechner BE, Liimatainen K, Lipzen A, Lukács Z, Mihaltcheva S, Morgado LN, Niskanen T, Noordeloos ME, Ohm RA, Ortiz-Santana B, Ovrebo C, Rácz N, Riley R, Savchenko A, Shiryayev A, Soop K, Spirin V, Szebenyi C, Tomšovský M, Tulloss RE, Uehling J, Grigoriev IV, Vágvölgyi C, Papp T,

- Martin FM, Miettinen O, Hibbett DS, Nagy LG. Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nat. Ecol. Evol.* 2019, 3(4):668-678.
- Varga T. Examining the macro-evolution and genetic background of complex multicellular structures in mushroom-forming fungi (Agaricomycetes). *Ph.D Thesis.* 2020.
- Várnai A, Umezawa K, Yoshida M, Eijssink VGH. The Pyrroloquinoline-Quinone-Dependent Pyranose Dehydrogenase from *Coprinopsis cinerea* Drives Lytic Polysaccharide Monooxygenase Action. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018, 84(11):e00156-18.
- Virágh M, Merényi Z, Csernetics Á, Földi C, Sahu N, Liu XB, Hibbett DS, Nagy LG. Evolutionary Morphogenesis of Sexual Fruiting Bodies in Basidiomycota: Toward a New Evo-Devo Synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2022, 86(1):e0001921.
- Vonk PJ, Ohm R. The role of homeodomain transcription factors in fungal development. *Fungal Biology Reviews.* 2018, 32(4):219-230.
- Wang L, Tian X, Gyawali R, Upadhyay S, Foyle D, Wang G, Cai JJ, Lin X. Morphotype transition and sexual reproduction are genetically associated in a ubiquitous environmental pathogen. *PLoS Pathog.* 2014, 10(6):e1004185.
- Wang Y, Niu X, Guo X, Yu H, Liu Z, Zhang Z, Yuan S. Heterologous expression, characterization and possible functions of the chitin deacetylases, Cda1 and Cda2, from mushroom *Coprinopsis cinerea*. *Glycobiology.* 2018, 28(5):318-332.
- Watanabe T, Tagawa M, Tamaki H, Hanada S. *Coprinopsis cinerea* from rice husks forming sclerotia in agar culture. *Mycoscience.* 2011, 52(2):152-156.
- Wessels J, De Vries O, Asgeirsdottir SA, Schuren F. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell.* 1991, 3(8):793-799.
- Wu T, Hu C, Xie B, Zhang L, Yan S, Wang W, Tao Y, Li S. A Single Transcription Factor (PDD1) Determines Development and Yield of Winter Mushroom (*Flammulina velutipes*). *Appl. Environ. Microbiol.* 2019, 85(24):e01735-19.
- Xie Y, Chang J, Kwan HS. Carbon metabolism and transcriptome in developmental paths differentiation of a homokaryotic *Coprinopsis cinerea* strain. *Fungal Genet. Biol.* 2020, 143:103432.
- Yamagishi K, Kimura T, Suzuki M, Shinmoto H. Suppression of fruit-body formation by constitutively active G-protein alpha-subunits ScGP-A and ScGP-C in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Microbiology.* 2002, 148(9):2797-2809.
- Zhang Y, Hou L. Alternate Roles of Sox Transcription Factors beyond Transcription Initiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(11):5949.

