

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológia Tanszék

37. OTDK Biológia szekció

Az AN5397 lakkáz deléciója és a deléció hatásának vizsgálata
*Aspergillus nidulans*ban

Kasuba Csenge
Biológus MSc.
Molekuláris-, immun- és mikrobiológia specializáció

Témavezetők:

Dr. Hamari Zsuzsanna
egyetemi docens

Dr. Varga Mónika
tudományos munkatárs



2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
1.1. Az <i>Aspergillus nidulans</i> általános bemutatása.....	3
1.2. A lakkáz enzimek jellemzése és biotechnológiai alkalmazásuk.....	4
1.3. A lakkázok szerepe az <i>A. nidulans</i> modellszervezetben	7
1.3.1. Lakkáz I (YA lakkáz).....	7
1.3.2. Lakkáz II	8
1.3.3. TilA lakkáz	8
1.3.4. Az LccA, LccB és LccC extracelluláris lakkázok <i>A. nidulans</i> -ban.....	8
1.4. A természetes fenolos vegyületek antimikrobiális hatása	9
2. CÉLKITŰZÉS	10
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
3.1. Alkalmazott törzsek.....	11
3.2 Alkalmazott primerek.....	11
3.3. Táptalajok és tápoldatok.....	12
3.4. Felhasznált oldatok.....	13
3.5. Polimeráz láncreakciók	13
3.5.1. A génszubsztitúciós kazetta elemeinek felszaporítása PCR segítségével.....	13
3.6. Agaróz gélelektroforézis	14
3.7. PCR termékek gélből történő visszaizolálása	15
3.8. Az <i>A. nidulans</i> transzformálása	15
3.9. Totál DNS kivonása <i>A. nidulans</i> ból.....	16
3.10. Southern blot analízis	16
3.11. Az <i>lccC</i> gén metabolitprofil-vizsgálatának mintaelőkészítése	17
3.12. UHPLC-ESI-HRMS mérés körülményei	17
4. EREDMÉNYEK	20
4.1. Az <i>lccC</i> génszubsztitúciós kazetta létrehozása	20
4.2. Az <i>lccC</i> deléciós törzs létrehozása <i>AfuriboB</i> génnel történő helyettesítéssel.....	22
4.3. A transzformálást követően szelektált <i>lccCΔ A. nidulans</i> törzsek ellenőrzése Southern blot vizsgálattal.....	23
4.4. Az <i>lccCΔ</i> törzsek növekedési vizsgálata	25
4.5. Az <i>lccC</i> gén metabolitprofiljának vizsgálata	30
5. ÖSSZEGZÉS ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	31
6. IRODALOMJEGYZÉK.....	33
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	35

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Az *Aspergillus nidulans* általános bemutatása

Az *Aspergillus nidulans* különböző környezeti niche-ekben előforduló fonalas gomba. Gyakran megtalálható talajban, bomló szerves anyagokban gazdag környezetben. Különféle élelmiszereket is képes kolonizálni, mellyel annak romlását okozza, valamint mikotoxinokat termelhet, amelyek mind az állatok, mind pedig az ember egészségére veszélyt jelentenek. Mindemellett jól tanulmányozott modellszervezet, széles körben alkalmazzák laboratóriumokban világszerte. Mint sok más fonalas gomba, az *A. nidulans* is képes számos másodlagos anyagcseretermék előállítására, melyek között a mikotoxinokon kívül megtalálhatunk antibiotikumokat és más bioaktív vegyületeket is. Ezek a gomba stacioner fázisában keletkeznek, és nem képezik részét a primer metabolizmusnak. Patogenitását tekintve nem tekintik emberre veszélyes mikroorganizmusnak, de okozhat opportunist fertőzéseket immunhiányos szervezetekben. A gombához közeli rokon fajok között az *Aspergillus* nemzetségen belül számos humán- és növénypatogén, valamint ipari szempontból fontos faj található, melyekkel ipari méretekben állítanak előszerves savakat (pl. citromsav) és enzimeket (proteázok, amilázok) (Scazzocchio, 2019).

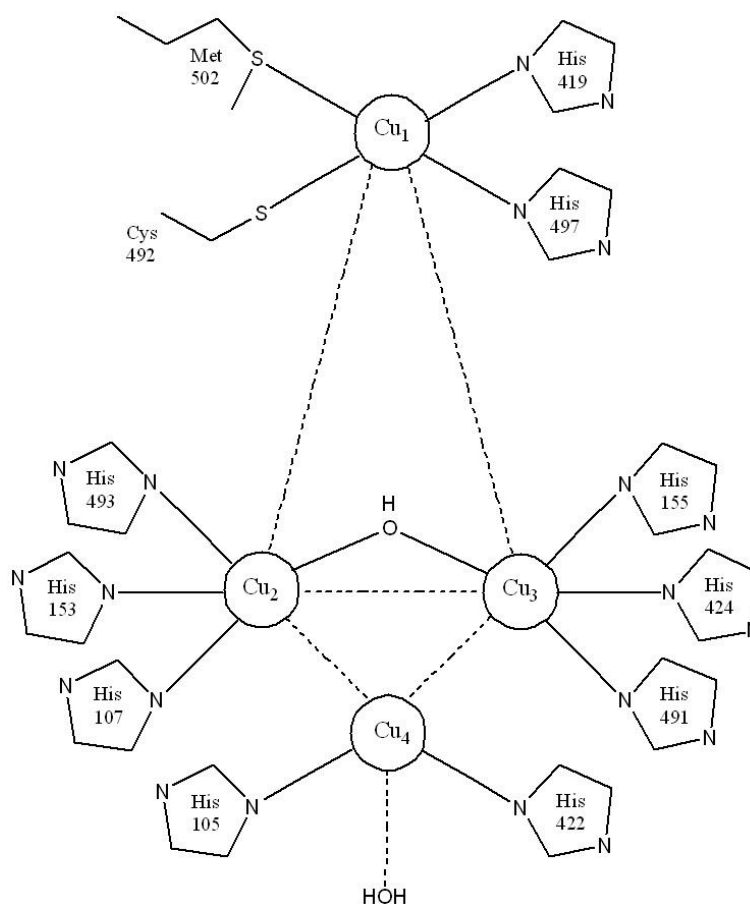
Az *A. nidulans* egy *Ascomycota* haploid homotallikus fonalas gomba. Háromféle életciklus zajlik benne, vegetatív, szexuális, valamint paraszexuális. Vegetatívan konídiospórákkal, szexuálisan pedig askospórákkal szaporodik. Vad típusú zöld színüket a spórák adják, azonban mutációk következtében keletkezhetnek más színű gombatelepek is (Scazzocchio, 2019). A 37 °C-on növeő telepeken a konídiofórok körülbelül 18 órával a spórák csírázása után jelennek meg. Ezzel szemben a szexuális spórák (askospórák) néhány nappal később fejlődnek ki zárt termőtestekben (kleisztotécium), amelyek négyzetcentiméterenként több ezret is számlálhatnak a micéliumpázsitban. A fiatal kleisztotéciumok puha, halvány rózsaszín testek, amelyek szilárd, sötétvörös héjjal határolódnak el a micéliumban. Fejlődésük legkorábbi szakaszától kezdve a kleisztotécium primordiumát számos, gömbölyű, vastag falú, sok sejtmagvú sejtek veszi körül, amelyeket Hülle-sejteknek neveznek (Hermann és *mtsai.*, 1983).

A konídiospórákban lévő zöld pigmentek jelenléte pozitívan korrelál az UV-fénnyel szemben mutatott rezisztenciával (Chang és *mtsai.*, 2019). Az askospórákban található vörös pigment is az UV-fénnyel szembeni védekezésben játszik szerepet (Chung és *mtsai.*, 1996).

Érdekes módon a vörös pigment bioszintézisének első intermedierei és a sterigmatocisztin bioszintézis korai intermedierei között szerkezeti hasonlóság figyelhető meg, ezért úgy gondolják, hogy a vörös pigmentet és a sterigmatocisztint létrehozó poliketid-szintáz rendszerek között evolúciós kapcsolat áll fenn (Brown és Salvo, 1994).

1.2. A lakkáz enzimek jellemzése és biotechnológiai alkalmazásuk

A lakkázok a polifenol-oxidázok csoportjába sorolt multicopper-oxidázok, melyek a katalitikus központjukban rézatomokat tartalmaznak. A lakkázok aktív centruma négy réziont tartalmaz: egy mononukleáris, úgynevezett 'kék' réziont (T1 hely) és egy három rézionból álló klasztert (T2/T3 hely), amely egy T2 réziont és két T3 réziont foglal magába (1. ábra). Az enzimpreparátum kékes árnyalatot ölt, így a négy réziont hordozó lakkázokat kék lakkázoknak nevezik (Morozova és *mtsai.*, 2007). Az olyan enzimeket, melyeknél hiányzik a kék színért felelős réz atom, "sárga" vagy "fehér" lakkázoknak nevezik, bár több szerző nem tekinti őket igazi lakkázoknak (Baldrian, 2006).



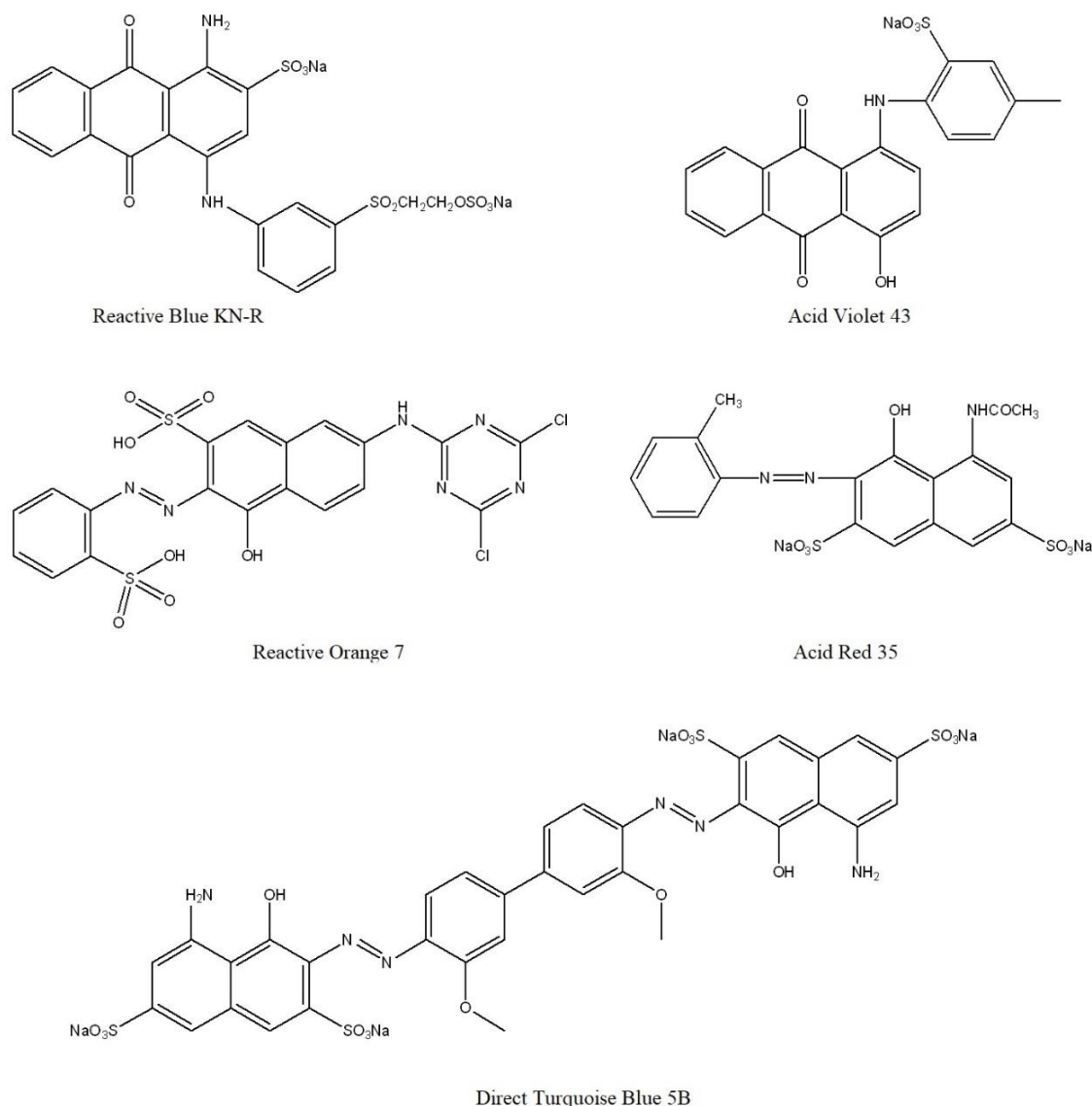
1. ábra. Sematikus ábra a *Bacillus subtilis* CotA lakkázáról (Morozova és *mtsai.*, 2007)

A gombákban jelenlévő lakkázkódoló gének, amelyek feltehetően génduplikációs eseményekből származnak, az életciklus során számos célzott funkciót tölthetnek be, és reagálhatnak a változó környezeti feltételekre, míg más lakkázok kibocsájtódva az extracelluláris térbe pl. a lignin bontásában játszhatnak szerepet, mely lehetővé teszi, hogy a gomba fakorhadékokon növekedjen (Sapmak, 2016). A lakkázok lokalizációja fiziológiai funkcióikhoz kapcsolódik. Az intracelluláris gombalakkázok részt vehetnek a sejtben termelt, kis molekulatömegű fenolos vegyületek átalakításában. A sejtfalakban és spórákban található lakkázok részt vehetnek a melanin és más, a sejtfalakat védő anyagok szintézisében (Morozova és *mtsai.*, 2007). A baktériumokban a lakkázok számos feladatot látnak el, például részt vesznek a morfogenezis folyamataiban, segítik a réz homeosztázist, részt vesznek a pigmentek, például a melanin és a barna spórapigmentek bioszintézisében, továbbá hozzájárulnak a spórák védelméhez az UV fény és oxidatív stresszorok (pl. hidrogén-peroxid) ellen (összefoglalta: Santhanam és *mtsai.*, 2011; Strong és Claus, 2011). A gombalakkázok is hasonló szerepeket látnak el (fontosak a sporuláció és a növényi patogenezis során), bár sokak élettani szerepét még nem sikerült feltárni. A gombalakkázokat sikerrel hasznosította az ipar és különböző mediátorok hozzáadásával széleskörűen használják őket ipari bioremediációs folyamatokban. Ez magába foglalja a lignocellulóz-vegyületek delignifikációját, az ipari színezékek eltávolítását és méregtelenítését, valamint a xenobiotikus vegyületek, peszticidek és más szennyező anyagok, például policiklusos aromás szénhidrogének bioremediációját (összefoglalta: Rivera-Hoyos és *mtsai.*, 2013; Li és *mtsai.*, 2014).

A lakkázok szerepe a delignifikáció során érdekes. *In vitro* katalizálhatják a lignin lebomlását, azonban a keletkező kis molekulatömegű komponensek újra-polimerizálódhatnak. Ezért a lakkázok fő szerepét nem a lignin oxidációjában látják, hanem az oxidációs termékek polimerizációjára gyakorolt hatásában. Fontos megjegyezni, hogy a lignin *in vivo* enzimatisuk bomlása néhány mérgező terméket eredményez, amelyek negatívan hatnak a micélium fejlődésére és fennmaradására (Morozova és *mtsai.*, 2007).

A lakkázokban rejlő nagy felhasználási potenciált tovább példázza textilipari alkalmazásuk. Ismeretes, hogy a reaktív színezékek, melyeket a pamutfestő ipar használ, fenolos vegyületek (pl. Reactive Blue KN-R, Acid Violet 43, Reactive Orange 7, Acid Red 35, Direct Turquoise Blue 5B) (2. ábra), melyek a festési eljárás után nagy mennyiségben kerülnek ki a szennyvízbe. Mivel összetett szerkezetük miatt nehezen bomlanak, felhalmozódásuk károsan hat a teljes ökoszisztémára. A szennyvízbe történő kijuttatás előtt a

festékanyagok hatástalanítása érdekében számos fizikai és kémiai módszert, például adszorpciót, oxidációt és ioncserét is alkalmaznak, azonban ezek a technikák nem csak költségesek, de még veszélyesek is. A fonalas gombákból származó lakkázok alkalmazása a festékek bontására egy öko-barát biodegradációs alternatívát jelent. Köszönhetően annak, hogy a lakkázok széles szubsztrátspecifitású enzimek, melyek oxidálják az aromás gyűrűket az oxigén vízzé redukálása közben (Li és mtsai., 2014), az ipari festékeket hatékonyan neutralizálják.



2. ábra. A gyakran használt pamutfestékek kémiai szerkezete ((Li és mtsai., 2014)

Napjainkban a lakkázok nem csak a pamutszínezék ipari hulladékok elbontásában játszanak fontos szerepet, hanem számos ipari alkalmazásban is, beleértve a különböző típusú

festékek szintelenítését, a már említett lignocellulóz anyagok lebontását, a papírpépesítést, valamint egyéb bioremediációt és más biotechnológiai alkalmazásokat (Li és *mtsai.*, 2014).

1.3. A lakkázok szerepe az *A. nidulans* modellszervezetben

Általában a *Basidiomycetes*-ek között találunk olyan fa-korhasztó fajokat, melyek régóta ismertek arról, hogy az intracelluláris lakkázok mellett extracelluláris lakkázokat is termelnek (Morozova és *mtsai.*, 2007). Az *Ascomycota* fajokról úgy tartották, hogy csak intracelluláris lakkázokat termelnek, melyek közé tartozik az *A. nidulans* YA (AN6635), Lakkáz-II (AN8581) és TilA (AN0901) enzime (Mander és *mtsai.*, 2006). 2006-ban Mander és munkatársai kimutatták, hogy létezik a fenti lakkázokkal homológ, filogenetikailag tőlük elkülönülő csoportot alkotó másik három lakkáz is az *A. nidulans*-ban, melyek kibocsájtódnak az extracelluláris térbe. Ezek az LccB (AN9170), LccC (AN5397) és LccD (AN0878), lakkázok (Mander és *mtsai.*, 2006). Élettani szerepük ismeretlen.

1.3.1. Lakkáz I (YA lakkáz)

A Lakkáz I (YA) funkcióvesztéses mutáció okozta fenotípus az egyik legrégebben ismert fenotípus az *A. nidulans* modellszervezet tanulmányozásának történetében. Már az 1960-as években izoláltak sárga konídiospóra-színmutánsokat, melyeket előszeretettel alkalmaztak genetikai keresztezések során partnerként zöld, azaz vad-típus színű törzsekkel. Később derült fény arra, hogy az *A. nidulans* zöld spórájú törzsei p-difenol-oxidázt (Lakkáz I) termelnek a konídiogenezis során, és a sárga konídiospórájú mutánsokból ez az enzim hiányzik (Clutterbuck, 1990). Ezt követően azonosították az enzim termeléséért felelős *yA* gént, melynek génterméke szükséges a zöld színű pigment prekursorának átalakításához (Aramayo és Timberlake, 1993). A prekursor pigment sárga színű, így az átalakítását végző enzim hiányában a konídiospórákban a zöld pigment helyett a sárga színű prekursoranyag halmozódik fel, amely a konídiospórák színét meghatározza.

Ahogy azt az 1.1. alfejezetben említettük, a konídiospórák pigmentációja fontos az UV-sugárzással szembeni tolerancia szempontjából, és hozzájárul a gombák túléléséhez a környezetben (Chang és *mtsai.*, 2019). A zöld pigment mellett más, további pigmenteket is termel a gomba, melyek az aszkospórák falában, vagy a hifákban felhalmozódva védenek az UV-sugárzástól (Chung és *mtsai.*, 1996), vagy a patogenezisben és egyes antifungális vegyületek elleni védelemben játszanak szerepet (Chang és *mtsai.*, 2020).

1.3.2. Lakkáz II

A Lakkáz II enzimet biokémiai vizsgálatok során azonosították és jellemezték. A Lakkáz II elektroforetikusan különbözik a Lakkáz I-től (YA) és a két enzim a szexuális fejlődés különböző stádiumában fejeződik ki, mely génszabályozásuk eltérő voltára utal. A Lakkáz II jellemzően a szexuális ciklus elején megjelenő termőtest kezdeményekben (primordiumokban) és a szexuális ciklus specializált védelmi, támasztó és tápláló szerepet betöltő Hülle-sejtjeiben jelenik meg (Hermann és *mtsai.*, 1983; Scherer és Fischer, 1998). További szerepükre vagy aktivitásukra vonatkozóan nincsenek információink.

1.3.3. TilA lakkáz

A *tilA* gén terméke egy 66,3 kDa méretű fehérjét kódol, mely 37,6%-ban azonos a YA-val. A TilA-ra jellemző, hogy N-terminálisán szekréciós szignált hordoz, és három jellegzetes rézkötő központot tartalmaz. Az enzim a hifacsúcsoknál lokalizálódik, innen kapta nevét a gén, tip laccase, azaz *tilA* (Scherer és Fischer, 2001). A gén deléciója vagy túlzott kifejezése semmilyen észrevehető fenotípust nem okoz (Scherer és Fischer, 2001; Mander és *mtsai.*, 2006).

1.3.4. Az LccA, LccB és LccC extracelluláris lakkázok *A. nidulans*-ban

Mander és munkatársai (2006) *in silico* vizsgálatok során azonosítottak négy lakkáz-szerű fehérjét (LccA-D), melyek nagy hasonlóságot mutatnak az YA-val. Míg az LccD filogenetikailag együtt klasztereződik az YA-val és extracelluláris lokalizációs szignált hordoz az N terminálisán, addig az LccA, LccB és LccC fehérjék az YA-tól különálló filogenetikai klasztert alkotnak, és csak az LccB és LccC hordoz extracelluláris lokalizációs szignált. Az *lccA-D* gének funkcionális vizsgálatát nem sikerült elvégezniük a szerzőknek, ugyanis a vizsgált környezeti körülmények és fejlődési állapotok mellett ezen gének nem fejeződtek ki. Munkájuk során a génfunkció vizsgálatához nem deléciós mutánsokat hoztak létre, hanem indukálható promóterrel (az alkohol dehidrogenázt kódoló *alcA* gén indukálható promóterével) kifejeztették az *lccA*, *lccB*, *lccC* és *lccD* géneket ezen génekre nézve vad típusú *A. nidulans*-ban.

Ahogy a jellemzően széles szubsztrátspecifitású lakkázok pozitív reakciót mutatnak az ABTS (2,2'-azinobisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)) szubsztráttal, így az extracelluláris szignált hordozó LccB, LccC és LccD lakkázokat indukáló szer jelenlétében túltermelő telepek az ABTS-t hordozó táptalajon a telepek körüli táptalaj zónában pozitív

reakciót mutattak. Ezzel igazolták, hogy az LccB, LccC és LccD valódi extracelluláris lakkázok, azonban továbbra sem derítettek fényt ezen enzimek élettani szerepére.

1.4. A természetes fenolos vegyületek antimikrobiális hatása

A természetes fenolos vegyületek kis molekulatömegű, természetben előforduló szerves vegyületek, amelyek egy vagy több fenolcsoportot tartalmaznak, melyekhez hidroxilcsoport kapcsolódik (Ansari és *mtsai.*, 2013; Zabka és Pavela, 2013). Repertoárjuk az egyszerű fenoloktól a polifenolokig, például flavonoidokig és tanninokig terjed. Legalább 8000 különböző növényi eredetű fenolos vegyület szerkezetét ismerjük (Estevinho és *mtsai.*, 2008). Jelentős szerepet játszanak az emberi egészség fenntartásában, amint azt gombaellenes, antioxidáns és rákellenes aktivitásuk is bizonyítja (Ansari és *mtsai.*, 2013; Puupponen-Pimia és *mtsai.*, 2001). Antimikrobiális hatásukhoz nagyban hozzájárul, hogy hidrofób jellegüknél fogva könnyen beépülnek a lipidmembránokba, mellyel felborítják az intracelluláris ionhomeosztázist, előidézik a citoszolikus pH csökkenését, megbontják a sejtek integritását és a sejtek pusztulását okozzák (Zabka és Pavela, 2013).

2. CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk során felvetettük annak a lehetőségét, hogy az eddig még ismeretlen funkciójú extracelluláris lakkázok az *A. nidulans*-ban védelmi funkciót töltenek be a természetben előforduló természetes, antimikrobiális hatású fenolos vegyületekkel szemben. Ezért célul tűztük ki az extracelluláris lakkázokat kódoló gének (*lccB*, *lccC* és *lccD*) delécióját, és egy tripla deléciós törzs létrehozását, melynek vizsgálatával a hipotézisünket majd igazolni tudjuk. Jelen dolgozat ezen célkitűzés megvalósításának első lépését célozza. A TDK-dolgozatban az *LccC* extracelluláris lakkázt kódoló gén delécióját tűztük ki célul, és az *lccCA* törzs növényi fenolokkal szemben mutatott érzékenység-vizsgálatát, valamint fenolos metabolit profiljának vizsgálatát terveztük végrehajtani.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Alkalmazott törzsek

1. táblázat: Alkalmazott *A. nidulans* törzsek

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.120	<i>riboB2; pabaA1; veA1</i>	recipiens törzs transzformáláshoz és szülői kontrol növekedési tesztekben, metabolitanalízis	(Hamari és mtsai., 2009)
HZS.982	<i>lccCΔ::AfuriboB⁺; riboB2; pabaA1; veA1</i>	növekedési teszt, metabolitanalízis	jelen munka
HZS.983	<i>lccCΔ::AfuriboB⁺; riboB2; pabaA1; veA1</i>	növekedési teszt, metabolitanalízis	jelen munka
HZS.984	<i>lccCΔ::AfuriboB⁺; riboB2; pabaA1; veA1</i>	növekedési teszt, metabolitanalízis	jelen munka

3.2 Alkalmazott primerek

2. táblázat: Az *lccC* gén deletálására és a génszubsztitúciós kazetta elkészítéséhez alkalmazott primer szekvenciák

Deléció <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>riboB</i> szelekciós marker génnel	
AN5397 up F	5' – gtcctggcttgtctcactttcac – 3'
AN5397 up NF	5' – gctgattgctcgcatctttcgc – 3'
AN5397 up Afribo KR	5' – gatcaaacgagccagactcctgccaagaggcagaagcatagagtgc – 3'
Afuribo AN5397 KR	5' – cattccacgtattacacgcattgaccgacatttggatggacaacagac – 3'
AN5397 down Afribo KF	5' – gtctgttgcattccaaatgctgggtcaatgcgtgtaatacgtggaatg – 3'
AN5397 down NR	5' – ctttatgtggccagctcaatagttctg – 3'
AN5397 ReTi frw	5' – ccaacctcaacctcgtttactc – 3'
AN5397 ReTi rev	5' – tgagctacttctgttcccgt – 3'
<i>lccC</i> up jel F	5' – aaggaagacagataccgtcagca – 3'
<i>lccC</i> up jel R	5' – gggcacttagacaagactggac – 3'

AN5397 Dell F	5' – agtctagttcctcatgtagcacga – 3'
AN5397 Dell R	5' – gcattgtagtggaattcaagaaccag – 3'
AfupabaA F	5' – gtatcttctgcaactacttctacttcag – 3'
AfupabaA R	5' – gagagaagctgcacttactgttattcg – 3'

3.3. Táptalajok és tápoldatok

Minimál tápoldat (MM):

2 v/v% sóoldat; 0,1 g/l glükóz; vitaminokkal és nitrogénforrással kiegészítve; (pH 6,8)

Komplett tápoldat (CM):

0,1 g/l glükóz; 1,5 g/l kazamiosavak (Bacto™); 1 g/l élesztőkivonat (Bacto™); 25 g/l agar (Bacto™); 2 g/l pepton (Bacto™); 2 v/v% sóoldat; komplex vitaminkeverékkel kiegészítve; pH 6,8

Sóoldat:

26 g/l KCl; 26 g/l MgSO₄×7H₂O; 76 g/l KH₂PO₄; 5 v/v% nyomelemtörzsoldat

Nyomelemtörzsoldat:

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

Növekedési teszthez felhasznált, növényi eredetű fenolos vegyületek:

Ferulasav oldat: 400 mM

77,6 g/l Ferulasav (Sigma) 50%-os etanolban

Kávésav oldat: 400 mM

87 g/l Kávésav (Sigma) 50%-os etanolban

Klorogénsav oldat: 400mM

141.6 g/l Klorogénsav (Sigma) 50%-os etanolban

p-Kumársav oldat: 400 mM

65,6 g/l p-Kumársav (Sigma) 50%-os etanolban

1,5 M NaCl

87,66 g/l NaCl (Biolab)

Menadion: 1mM

10 g/l Menadion (Sigma) acetonban

3.4. Felhasznált oldatok

Agaróz gélelektroforézishez használt oldatok:

1x Tris-acetát-EDTA (TAE) puffer; 8 g/l agaróz; 5 µg/ml etídium-bromid (EtBr); 6× loading oldat (Fermentas); 1 Kb DNS molekulásúly marker (Biosystems)

1x TAE: 40 mM Tris-HCl; 20 mM ecetsav; 1 mM EDTA; pH 7,5

Protoplasztáláshoz használt oldatok:

TN1: 5,22 m/v% KCl; 0,735 m/v% CaCl₂

TN2: 60 m/v% PEG (polietilén-glikol) 4000; 1,214 m/v% Tris; 0,735 m/v% CaCl₂

Totál DNS kivonáshoz használt oldatok:

LETS puffer: 4,235 g/l LiCl; 3,72 g/l Na₂EDTA; 0,2 v/v% SDS; 1,21 g/l Tris-HCl; pH 7,4

PCI: fenol (pH 7); kloroform: izoamilalkohol, 25:24:1 arányú elegye

kloroform: izoamil-alkohol 24:1 arányú elegye

Southern Blot-hoz használt oldatok:

Denaturáló oldat: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

Neutralizációs oldat: 0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 0,001 M EDTA

20× SSC oldat: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrát

Hibridizációs puffer: 5× SSC, 0,1% N-lauril-szarkozin, 0,02% SDS, 1% Blocking reagents

1. mosó oldat: 2× SSC, 0,1% SDS

2. mosó oldat: 0,5× SSC, 0,1% SDS

10x-es 1. puffer: 1 M maleinsav, 1,5 M NaCl

2. puffer: 1% blocking reagents 1×-es 1, pufferben oldva

3. puffer: 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂

3.5. Polimeráz láncreakciók

3.5.1. A génszubsztitúciós kazetta elemeinek felszaporítása PCR segítségével

A Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS polimerázhoz (Thermo Scientific™) mellékelt gyártói utasításoknak megfelelően állítottuk össze a polimeráz láncreakciók (PCR) reakciókeverékét, 50 µl végtérfogatban. A PCR reakciókeverék az alábbi komponenseket tartalmazta:

- 0,5 μ M forward és reverz primerek
- 1 $\times$ Phusion HF puffer
- 4 $\times$ 0,2 mM dNTP-k (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 0,5 μ l Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS Polimeráz
- 100 ng DNS templát

A polimerizáció körülményei:

- elődenaturáció: 98 °C, 30 s
- denaturáció: 98 °C, 10 s
- hibridizáció: 62 °C, 30 s
- polimerizáció: 72 °C, X perc (X= várt PCR termék hossz (kb) / 2)
- utópolimerizáció: 72 °C, 2 $\times$ X perc
- hűtés: 12 °C, ∞

A Southern blot hibridizáció során alkalmazásra került DNS próba DIG-dUTP jelölését a DIG-dUTP jelölő és hibridizáló kit (Roche) segítségével és Dream Taq polimeráz (Zymo Research) alkalmazásával végeztük el. A reakcióelegyet 30 μ l végtérfogatban az alábbiak szerint állítottuk össze:

- 1 $\times$ 1. puffer
- 20 mM MgCl₂
- 1,2 mM DIG-dUTP-vel kiegészített dNTP keverék
- 0,3 μ M forward és reverz primerek
- 0,075 U/ μ l Dream Taq Polimeráz
- 50-250 ng vad típusú totál DNS kivonat

3.6. Agaróz gélelektroforézis

A PCR során képződött termékek minőségi és mennyiségi vizsgálatát agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk és ellenőriztük 0,8 m/v% agaróz gélen. A reakcióelegyekből 1-1 μ l-t futtattunk meg TAE pufferben. A futtatás BioRad horizontális gélelektroforézis készülékkel történt 100 V feszültségen. A megfuttatott DNS láthatósága érdekében 5 μ g/ml etídium-bromidot mértünk a gélbe, mely a DNS-hez kötődik és UV fénnel megvilágítva fluoreszkál.

3.7. PCR termékek gélből történő visszaizolálása

A PCR termékeket preparatív mennyiségben 0,8 m/v% agaróz gélen megfuttattuk, a szükséges DNS-t tartalmazó fragmentumokat a gélből kivágtuk, majd a Gel/PCR Fragments Extraction KIT (Geneaid) segítségével a gyártó utasításai alapján a DNS-t visszaizoláltuk. Az izolálás után 1-1 µl mennyiségek 0,8%-os agaróz gélen történő futtatásával ellenőriztük az izolált DNS mennyiségét.

3.8. Az *A. nidulans* transzformálása

Az *A. nidulans* transzformálását celofántenyészetten létrehozott protoplasztok felhasználásával hajtottuk végre (Antal és *mtsai.*, 1997; Ferenczy és *mtsai.*, 1975; Kevei és Peberdy, 1977). Tenyészeinket celofánnal fedett komplett táptalajon neveltük 37 °C-on, 14-16 órán át. Az inkubációs idő elteltével a celofánréteget lefejtettük, majd fejjel lefelé protoplasztáló folyadékba helyeztük maximum 2 órára, 25 °C-on. Protoplasztáló folyadékként 10 mg/ml 0,7 M KCl Glucanex (Novozym) oldatot használtunk. A sikeresen létrejött protoplasztokat 0,7 M KCl oldattal mostuk le a celofán felületéről, majd átszűrtük egy 75-100 µm-es nylon filteren, melyen fennakadnak a micéliális szennyeződések, a sejtfal nélküli sejtek pedig átjutnak. A protoplasztokat ezután centrifugálással ülepítettük 15 percen át 3500 rpm-en, majd a keletkező pelletet 0,7 M KCl oldattal mostuk és centrifugáltuk. Végül a protoplaszt pelletet 1-2 ml 0,7 M KCl-ban felfuszpendáltuk és megállapítottuk a protoplasztok koncentrációját Bürker-kamrás sejtszámolás segítségével. Transzformáláshoz 5×10^6 protoplasztot használtunk fel. 5×10^6 protoplasztot 5 percig 2500 rpm-el ülepítettünk, majd a protoplasztokat 200 µl TN1 oldatban vettük fel, melyhez 5-10 µg DNS-t és 50 µl TN2 oldatot mértünk, majd 30 percen keresztül jégen inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével 1 ml TN2 oldatot pipettáztunk a reakcióelegyhez, majd óvatos homogenizálást követően 5 percen át inkubáltuk 25 °C-on. Ezt követően a TN2 oldatban jelen lévő toxikus PEG-tartalmat 10 ml 0,7 M KCl hozzáadásával, majd a protoplasztok ülepítésével mostuk ki a rendszerből. A protoplaszt pelletet 1 ml KCl oldatban vettük fel, majd 50 ml 40 °C-os top agar MM-ba kevertük (csak para-amino-benzoetsavat tartalmaz, riboflavint nem) és 10 db para-amino-benzoetsavval kiegészített MM csésze felületén eloszlattuk. Sikeres transzformáció esetén a szelekciós marker gén beépülése a gombagenomba komplementálja a törzs *riboB2* okozta riboflavin auxotrófiáját, így a regenerálódott transzformáns protoplasztok minimál táptalajon telepeket tudnak képezni.

3.9. Totál DNS kivonása *A. nidulans*ból

A CM táptalajon nevelt tenyészetekről 10^9 db spórát gyűjtöttünk 10 ml 0,01%-os Tween 80 oldatba. Az elkészült konídiospóra szuszpenzió 1 ml-ét a szükséges vitaminokkal kiegészített 100 ml MM tápoldatba oltottuk és egy éjszakán át neveltük 37 °C-on 180 rpm rázatás mellett. A keletkezett micéliumokat összegyűjtöttük, mostuk desztillált vízzel, majd itatós papírba csomagolva szárazra csavartuk és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Ezt követően hideg dörzsmozsárban liszt finomságúra őröltük a micéliumokat folyékony nitrogén folyamatos adagolása mellett. 100 mg micéliumhoz 800 µl LETS puffert adtunk, vortexeltünk, majd extraháltuk 800 µl PCI-vel. Ezt követően centrifugáltuk az elegyet 10 percre 12.000 rpm-en, és a DNS-t hordozó vizes fázist legyűjtöttük, majd ezt kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú keverékével extraháltuk és a legyűjtött vizes fázisból a DNS-t tized térfogat 3 M Na-acetát hozzáadása után ekvivalens térfogat izopropanollal kicsaptuk. Ezt fél óra -20 °C-os hűtés követte, majd 10 perc 12.000 rpm-en történő centrifugálással ülepitettük a DNS csapadékot, melyet 70%-os etanollal mostunk. A pelletet száradás után 0,05 mg/ml RNáz oldatban oldottuk fel. A minták DNS tartalmát agaróz gélelektroforézissel DNS molekulásúly-marker jelenlétében ellenőriztük.

3.10. Southern blot analízis

Az elkészített totál DNS kivonatokból azonos DNS mennyiségeket *Hind*III restrikciós endonukleázzal egy éjszakán át emésztettük. Egy éjszakán át, 37 °C-on történő inkubálás után a DNS-t izopropanolos kicsapást követően 15 µl desztillált vízben koncentráltuk, majd etídium-bromid mentes, 0,8 m/v% agaróz gélen, 100 V feszültség alatt megfuttattuk DIG-jelölt DNS Molekulásúly Marker jelenlétében. A futtatást követően a gél etídium-bromidos festő edényben 10 percre hagytuk festődni, majd $2 \times 1,5$ percre UV-fényben exponáltuk, hogy a nagyobb méretű DNS-fragmentumok összetörjenek és könnyebben átjussanak a blottoló filterre. A gél 30 percre denaturáló oldatban ráztattuk, majd 2×20 percre neutralizációs oldatba helyeztük. A DNS-fragmentumokat Amersham Hybond-N (GE Healthcare) filterre blottoltuk egy éjszakán át $20 \times$ SSC oldattal történő kapilláris blottolással. Másnap a filtert UV-fénnyel $2 \times 1,5$ percre megvilágítottuk, hogy DNS kovalensen rögzüljön a filteren. Ezt követően végeztük el a filter hibridizálását és a hibridizációs jel detektálását a DIG-dUTP detektáló kit (Roche) felhasználásával, a gyártó utasítása alapján. A filtert 1 óra keresztül prehibridizáltuk jelölt anyagot nem tartalmazó hibridizációs pufferben, majd DIG-dUTP-vel jelölt próbával kiegészített hibridizációs pufferben inkubáltuk egy éjszakán át, hibridizációs

sütőben forgatva, 65 °C-on. Másnap a filtert az 1. mosó oldattal 2 × 5 percig szobahőmérsékleten, a 2. mosó oldattal 2 × 15 percig 65 °C-on mostuk, majd 1×-es 1. pufferben 2 percig forgattuk szobahőmérsékleten. Az 1. puffert 2. pufferre cseréltük és 30 percen át inkubáltuk a filtert szobahőmérsékleten. Ezt követően a 2. puffert lecseréltük antitestkonjugátummal (Anti-Dioxigenin-AP Fab fragments Roche) kiegészített 2. pufferrel és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Végül a filtert 2 × 15 percig az 1. pufferben forgattuk, majd a 3. pufferrel leöblítettük. A jelölt próbával hibridizált DNS-szakaszokat NBT/BCIP Stock oldattal (Roche) kiegészített 3. pufferben történő inkubációval tettük láthatóvá.

3.11. Az *lccC* gén metabolitprofil-vizsgálatának mintaelőkészítése

3 napos szilárd tápközegen növesztett micéliumok konídiospóráit összegyűjtöttük, fagyasztottuk, majd liofileztük. A liofilezett mintákból 20 mg mennyiséget mértünk ki, melyhez 1 ml metanol/víz 8/2 (V/V%) elegyét adtuk. A konídiumokat golyósmalomban 25 Hz frekvencián, 30 s időtartamig homogenizáltuk, majd 10 percig 80 kHz frekvencián ultrahanggal kezeltük. Centrifugálást követően (20.000 g, 10 min, 4 °C), a felülúszóból 200 µl-t sötét polipropilén mikrofialába pipettáztunk, és a minta metabolitösszetételét HPLC-ESI-HRMS-módszer segítségével vizsgáltuk.

3.12. UHPLC-ESI-HRMS mérés körülményei

Az UHPLC-HRMS rendszer egy UltiMate™ HPG-3400RS pumpából, egy UltiMate™ SRD-3400 gáztalanítóból, egy UltiMate 3000 WPS-3000 automata mintaadagolóból, egy UltiMate™ TCC-3000RS oszloptermosztátból, egy UltiMate™ 3000 VWD UV-detektorból, valamint egy Thermo Scientific Q Exactive Plus tömegspektrométerből állt.

A metabolitok elválasztását Gemini-NX C18 150 × 2 mm, 3 µm (Phenomenex) oszlopon valósítottuk meg, melyhez Gemini NX C18 előtétoszlopot csatlakoztattunk.

Az alkalmazott mozgófázis víz + 0,1% hangyasav (A eluens), illetve acetonitril/metanol 1/1 (V/V %) + 0,1% hangyasav (B eluens) volt. A vizsgálatok során az alábbi gradiens elúciót alkalmaztuk (3. táblázat).

3. Táblázat Az elválasztás gradiens programja.

t (min)	B konc. (%)
0,0	5
2,0	5
13,0	95
19,0	95
19,5	5
24,0	5

Az áramlási sebességet 0,2 ml/perc-re állítottuk, az elválasztást 25 °C-os hőmérsékleten valósítottuk meg. Az injektálási térfogat 5 µl volt.

A tömegspektrometriás detektálás körülményeit a 4. táblázat foglalja össze. A mintákat pozitív és negatív ionizációs módban mértük.

4. Táblázat A hangolt tömegspektrometriás paraméterek.

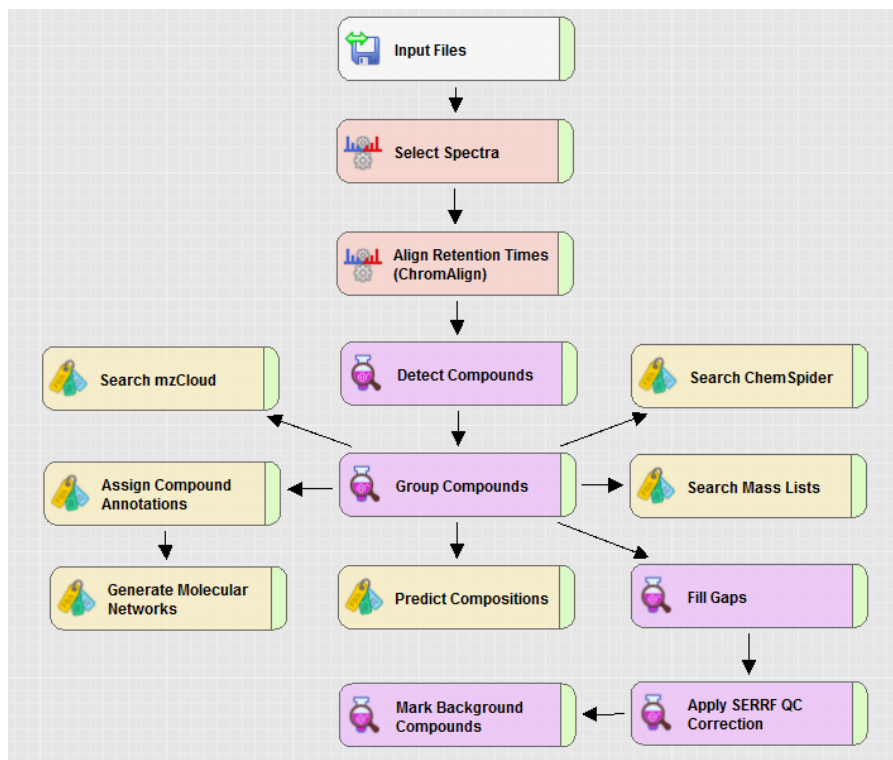
Paraméter	Értéke
Ionforrás	HESI
Spray feszültség	3500 V
Forrás hőmérséklet	300 °C
Porlasztó gáz	30
Kísérő gáz	10
Kapilláris hőmérséklet	320 °C
S-lencse RF	50

A minták metabolitösszetételét pásztázó-adatfüggő fragmentációs (full scan – data-dependent MSMS) módszerrel vizsgáltuk az alábbiakban részletezett körülmények között (5. táblázat):

5. Táblázat: A pásztázó-adatfüggő fragmentációs MS-módszer beállításai.

Paraméter	Értékek
Pásztázó (full scan)	
felbontás	70 000
tömegtartomány	100-1500 <i>m/z</i>
AGC	1x10 ⁶
Adatfüggő MSMS	
felbontás	17 500
AGC	2x10 ⁵
Normalizált ütközési energia	35
Kvadrupól izolációs ablak	0,4 <i>m/z</i>

Az UHPLC-ESI-HRMS-mérések során az adatgyűjtés Trace Finder 4.0 szoftverrel történt. Az analízis eredményeképpen kapott adatfájlokat a Compound Discoverer 3.3 program felhasználásával elemeztük a 3. ábrán feltüntetett munkafolyamat szerint.



3. ábra: Az összehasonlító elemzés munkafolyamata.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az *lccC* génszubsztitúciós kazetta létrehozása

A géndelécíóhoz felhasznált szelekciós marker gént a recipiens törzs kijelölése után választottuk meg. A kiválasztott recipiens törzs, a HZS.120, riboflavin és para-amino-benzoésav auxotrófiával rendelkezik (*riboB2 pabaA1*), ezért a génszubsztitúciós kazettát úgy terveztük, hogy a benne lévő szelekciós marker gén a *riboB2* mutációt komplementálja. A szelekciós marker gént *A. fumigatus*ból amplifikáltuk fel, mivel az *A. nidulans* közeli rokona, és az *A. nidulans* genetikai mutációk az *A. fumigatus* megfelelő vad típusú ortológ génjeivel komplementálhatóak. A nem-fajazonos szelekciós marker gén használatával ki tudjuk zárni azt a nem kívánatos eseményt, hogy a transzformáló kazetta szelekciós marker génje a genomi megfelelőjével rekombinálódjon. Laboratóriumunkban már számos esetben használtuk sikeresen az *A. fumigatus* *riboB* kódoló szekvenciát genom módosító transzformációs kazettákban az *A. nidulans* *riboB2* mutáció komplementációjára.

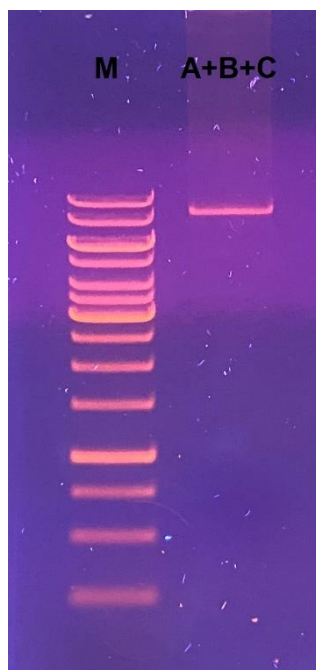
A génszubsztitúciós kazetta három komponensből állt (A, B és C). A B komponens volt a szelekciós marker gén, és a B komponens határoló A és C komponensek pedig a kazetta irányított genomi beépülését szolgálták, azaz a deletálni kívánt gén közvetlen upstream és downstream genomi környezetének egy-egy részletei voltak, melyek homológ rekombinációra lépnek a genomi megfelelőjükkel a transzformáció során. Az A, B és C komponenseket PCR segítségével felszaporítottuk, majd az elkészült termékeket preparatív gélen megfuttattuk és a DNS-t gélből visszaizoláltuk. Az izolált PCR-termékekből 1 µl-t futtattunk meg agaróz gélen ellenőrzés céljából (4. ábra). A PCR termékeket a GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific™) DNS molekulasúly markerhez hasonlítva megállapítottuk, hogy a méretek megfelelnek a tervezett 2852 bp, 3063 bp és 3233 bp termék hosszaknak, amik az A, a B és a C komponensek amplifikálása után létrejönnek.



4. ábra: A génszubsztitúciós kazetta összeszerelendő komponenseinek ellenőrző futtatása

M: GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific™) DNS molekulasúly marker; A: homológ rekombinációt biztosító komponens, az *lccC* gén upstream régiója; B: a *riboB2* okozta riboflavin auxotrófiát komplementáló marker gén az *A. fumigatus*-ból (*AfuriboB*); C: homológ rekombinációt biztosító komponens, az *lccC* géntől downstream elhelyezkedő szekvencia

Az elkészült, felszaporított kazettakomponenseket összeszerelő PCR reakció alkalmazásával építettük egyetlen molekulává, melybe a gélről izolált A, B és C komponenseket 1 : 2 : 1 molekulamennyiség arányban használtuk fel A komponens specifikus nested forward és C komponens specifikus nested reverz primerek segítségével. Az összeszerelt PCR-termékből 1 µl-t futtattunk meg ellenőrzés céljából 0,8%-os agaróz gélen (5. ábra). A PCR termékeket a GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific™) DNS molekulasúly markerhez hasonlítva látható, hogy a várt, 8219 bp-os terméket kaptuk.

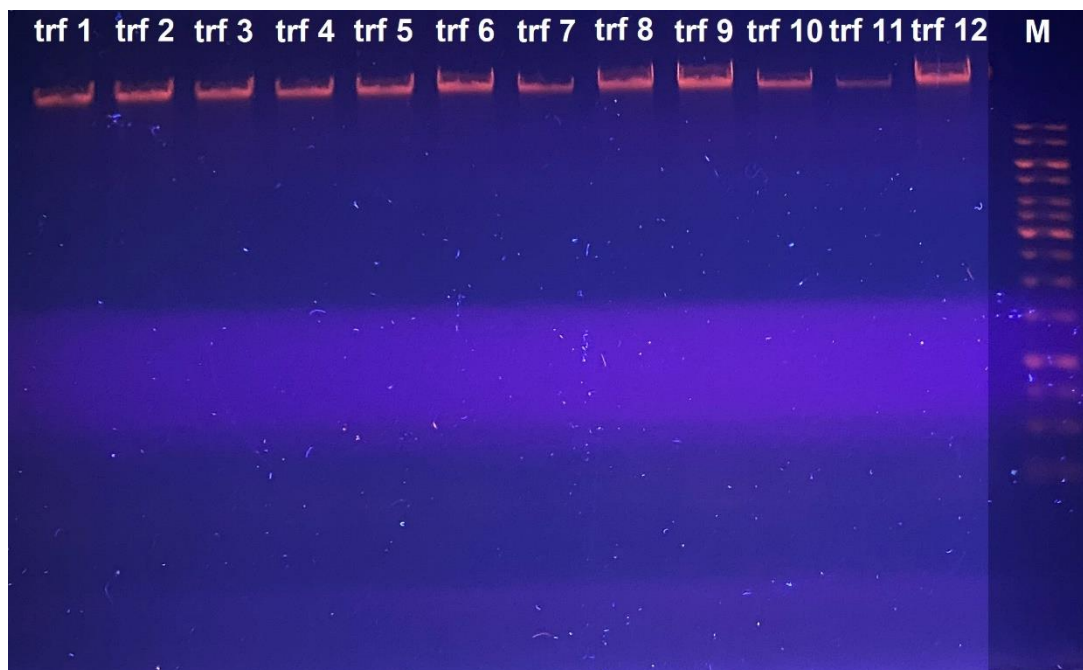


5. ábra: A génszubsztitúciós kazetta összeszerelt komponenseinek ellenőrző futtatása

M: GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific™) DNS molekulasúly marker; A+B+C: az összeszerelő PCR-rel létrehozott 3 komponensből álló deléciós kazetta

4.2. Az *lccC* deléciós törzs létrehozása *AfuriboB* génnel történő helyettesítéssel

Az összeszerelt 3 komponensű génszubsztitúciós kazettát hordozó PCR-terméket betranszformáltuk a recipiens *riboB2*; *pabaA1*; *veA1* (HZS.120) törzsbe. A csak para-amino-benzoésav vitaminnal kiegészített minimál szelekciós táptalajon kapott 45 transzformáns telepből 12 izolátumot választottunk ki Southern blot hibridizációs ellenőrző vizsgálat elvégzéséhez, és ezeket az izolátumokat szelekciós táptalajon történő szélesztéssel tisztítottuk. A tisztított transzformánsokat ugyanerre a szelekciós táptalajra újból leoltottuk és a tisztított tenyészetek telepeiről gyűjtött 5×10^5 db konídiospórával 50 ml szelekciós tápoldatot oltottunk be, melyet 16 órán át 37 °C-on rázatva inkubáltuk. Az így felnevelt gomba tenyészetből totál DNS-t vontunk ki. A minták 1 µl-ét ellenőrzésként megfuttattuk gélen GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific™) DNS molekulasúly marker mellett (6. ábra).



6. ábra: A 12 transzformáns izolált DNS-e megfuttatva ellenőrző gélen
trf 1-12: vizsgált transzformáns törzsek; M: GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific™)
DNS molekulásúly marker

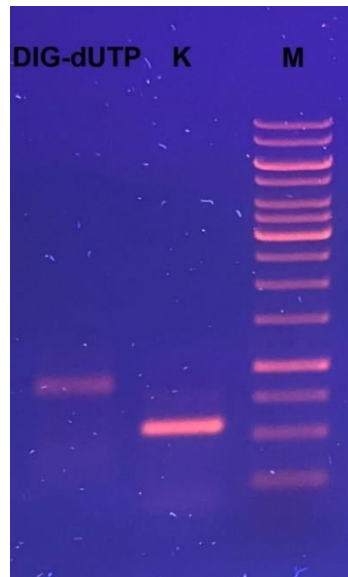
4.3. A transzformálást követően szelektált *lccCΔ A. nidulans* törzsek ellenőrzése Southern blot vizsgálattal

A transzformánsok kivont totál DNS-ének azonos DNS mennyiségeit (6. Táblázat) emésztettük *Hind*III restrikciós endonukleázzal Southern hibridizáció céljából.

6. Táblázat: A kivont totál DNS mintákból *Hind*III emésztésre felhasznált térfogatok

trf 1	trf 2	trf 3	trf 4	trf 5	trf 6	trf 7	trf 8	trf 9	trf 10	trf 11	trf 12
40 µl	35 µl	35 µl	35 µl	35 µl	30 µl	40 µl	30 µl	25 µl	40 µl	70 µl	25 µl

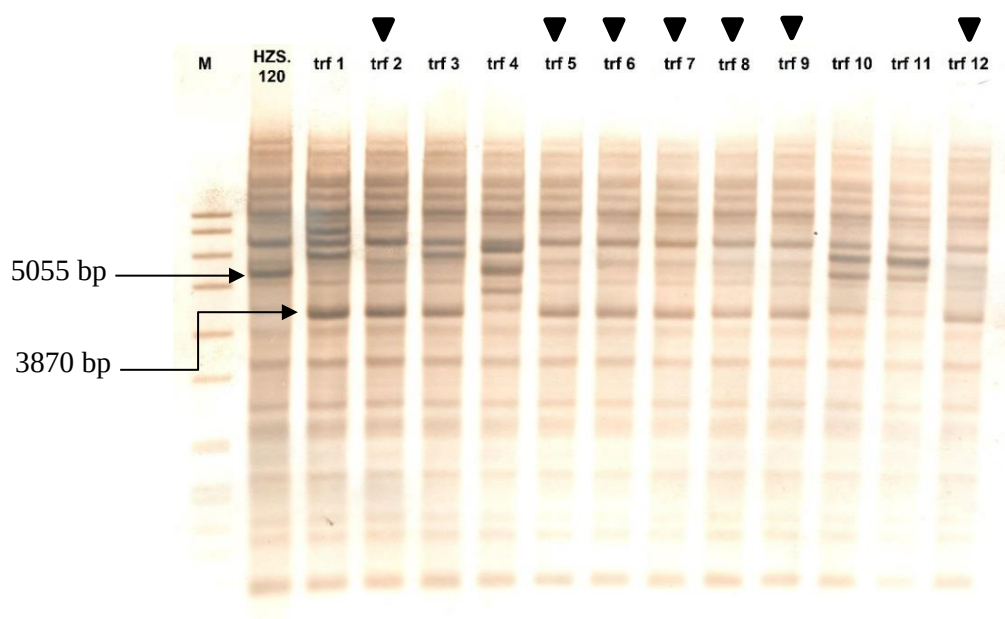
A Southern hibridizációhoz szükséges DIG-dUTP-jelölt DNS próbát a 3.5.1. pontban leírtak alapján készítettük el. A jelölt próba az *lccC* géntől upstream, a nested A komponensen belüli 500 bp hosszú genomi szekvencia volt ("lccC up" DIG-dUTP jelölt DNS próba), melyet az "lccC up jel F" és az "lccC up jel R" primerekkel amplifikáltunk a jelölő PCR reakcióban. Negatív kontrol gyanánt egy jelöletlen PCR-t is összemértünk, hogy a jelöletlen PCR-termék méretét a jelölt PCR-termékkel összehasonlítva meg tudjuk állapítani a jelölés sikerességét, amennyiben a jelölő reakcióban képződött PCR-termék az 500 bp méretű PCR-termékbe random számban beépült DIG-konjugált dUTP-k miatt lassabban migrál az agaróz gélben, mint ahogyan a jelöletlen reakcióból származó 500 bp-os termék migrál (7. ábra).



7. ábra: A Southern hibridizációhoz szükséges elkészített DIG-dUTP jelölt DNS próba ellenőrző futtatása

DIG-dUTP: DIG-dUTP jelölt DNS próba; K: jelöletlen PCR termék; M: GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific™) DNS molekulasúly marker

Közvetlenül a jelölt PCR-terméket használtuk fel a Southern hibridizáció során DNS-próbaként. A *Hind*III által emésztett totál DNS-eket 0,8%-os agaróz gélen megfuttattuk, majd $20 \times$ SSC-ben történő kapilláris blottolással Hybond-N (GE Healthcare) filterre transzferáltuk. A hibridizálás az "lccC up" DIG-dUTP jelölt DNS próbával történt, ezt követően detektáltuk a hibridizációs jelet a filteren (8. ábra).



8. ábra: A Southern hibridizációs membrán

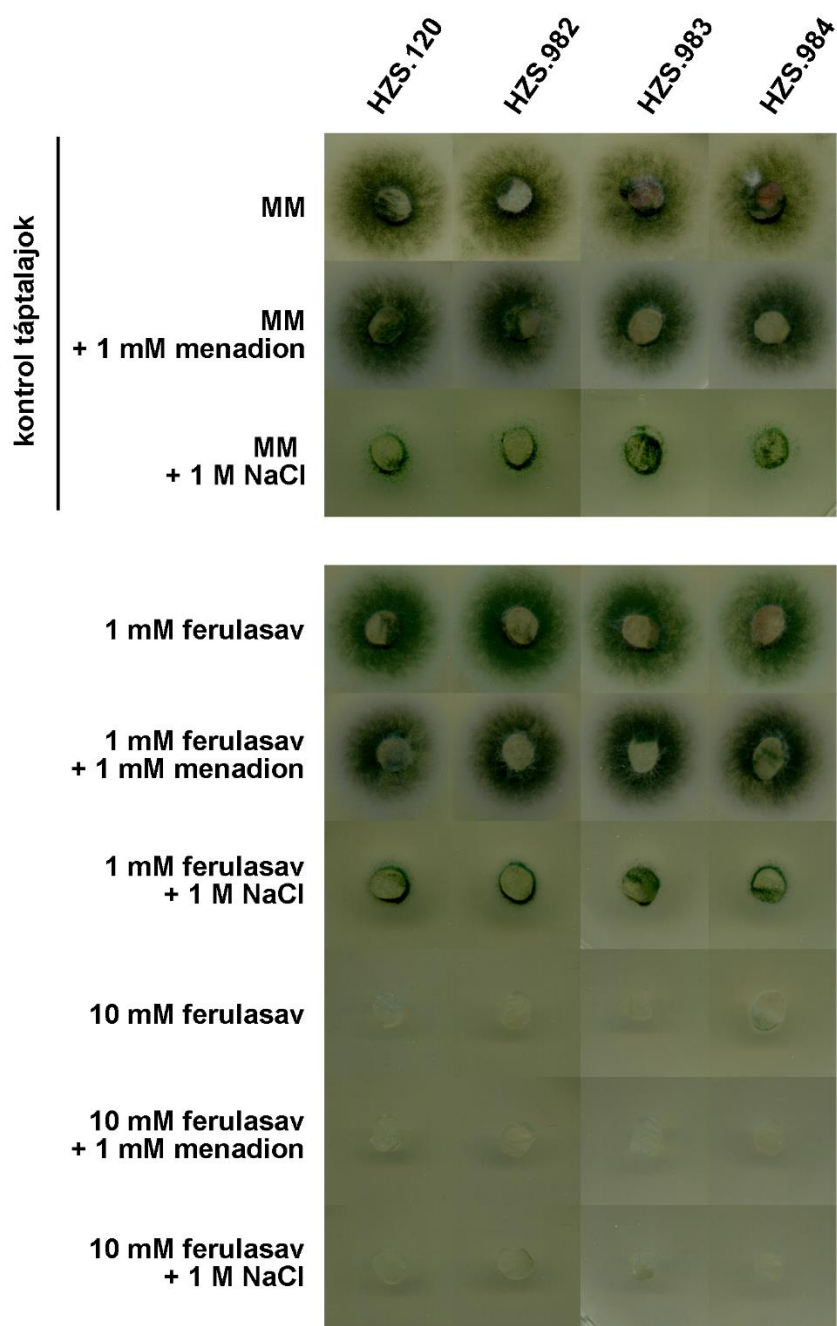
M: DIG-jelölt DNS Molekulasúly Marker; HZS.120: szülői törzs; trf 1-12: vizsgált transzformáns törzsek; háromszögek: jó deléciós transzformánsoknak bizonyult törzsek

A Southern hibridizáció során számos aspecifikus hibridizációs jelet kaptunk, ami akkor fordul elő, ha a DNS-próba mennyisége az optimálisnál magasabb a hibridizáció során. Ettől függetlenül, a hibridizációs filteren erős jelet mutatva a várt specifikus vad típusú 5055 bp-os jel megjelent a recipiens kontrol mintában, illetve a várt 3870 bp deléciós jelet is egyértelműen azonosítani lehetett a jó transzformánsokban (háromszögekkel jelölt transzformánsok a 8. ábrán). A hibridizációs eredmény alapján a 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12 számú transzformánsok bizonyultak jó deléciós transzformánsoknak, ahol bekövetkezett a várt deléciós esemény és ektopikus integráció nem fordult elő. A további munkánkban a 2, 5 és 6 számú transzformánsokkal dolgozunk, melyek innentől HZS.982, HZS.983 és HZS.984 néven kerültek használatba és a HZS.120 szülői kontrollal együtt lettek vizsgálva.

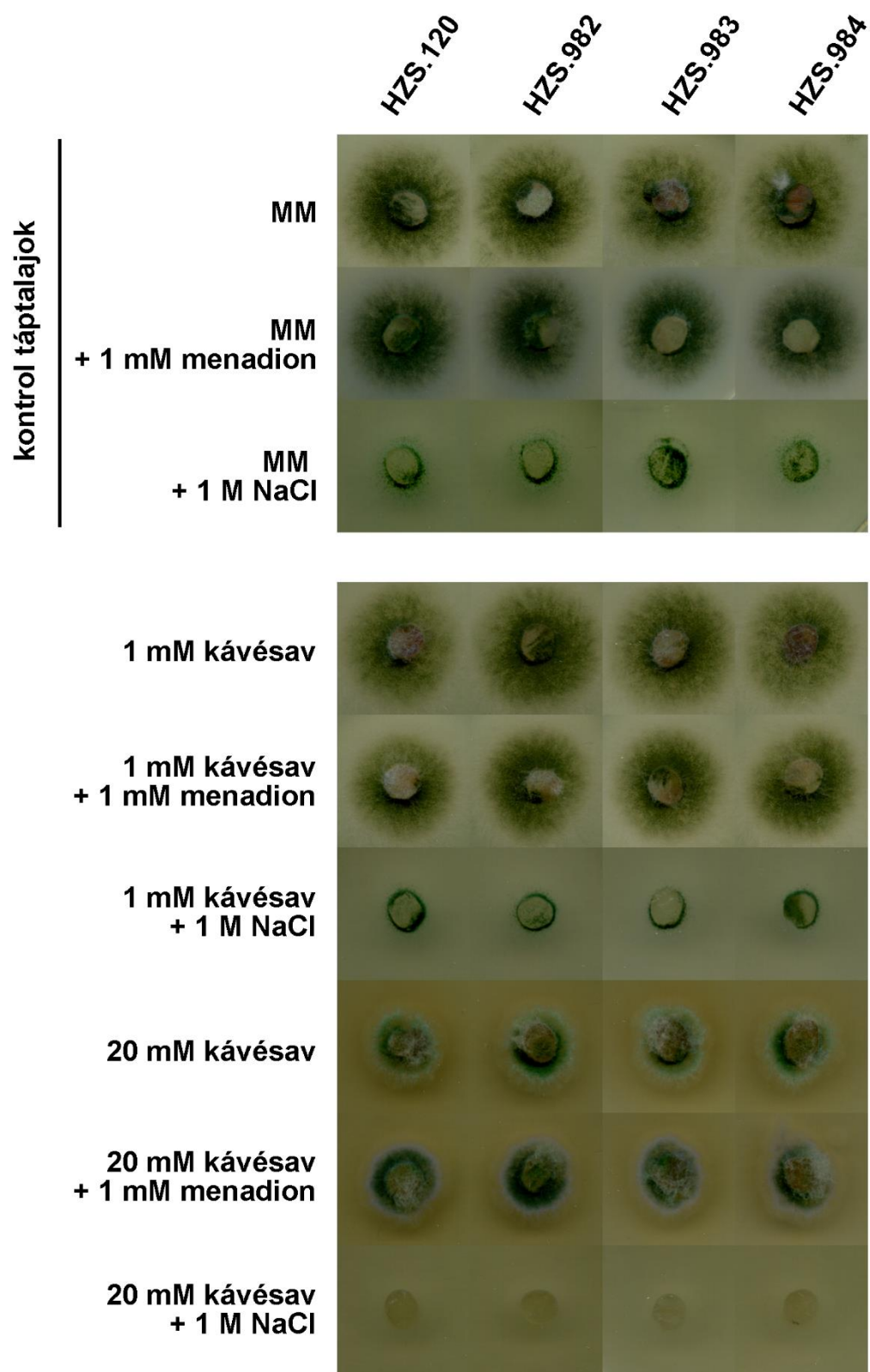
4.4. Az *lccCΔ* törzsek növekedési vizsgálata

Bár az *lccC*-n kívül az *lccB* és az *lccD* gének is szekretált lakkázt kódolnak (Mander és *mtsai.*, 2006) és ezért ésszerű azt feltételezni, hogy a hipotézisünkben feltételezett szekretált lakkáz szerepet csak az *lccC*, *lccB* és *lccD* hármas deléciója esetén lesz módunkban igazolni, elvégeztük azokat a növekedési teszteket, amiket a jövőben majd tripladeléciós mutánsok is vizsgálni szeretnénk. Vizsgáltuk az *lccCΔ* transzformánsok és a recipiens szülő

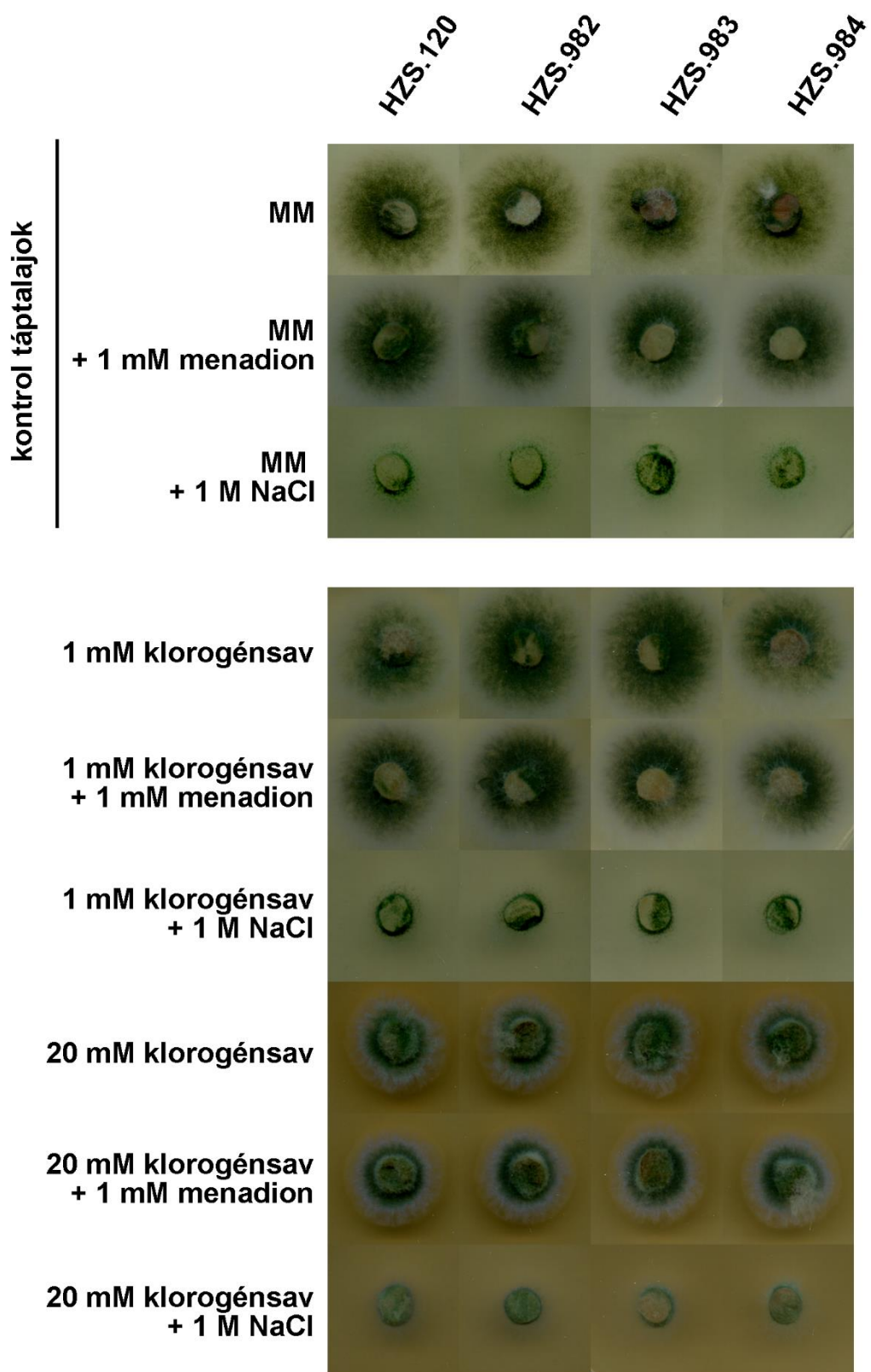
növekedését négy természetes növényi fenolos vegyületen, valamint ugyanezen vegyületeket oxidatív (1 mM menadion) és ozmotikus stresszorral (1 M NaCl) kombinálva (9-13. ábra).



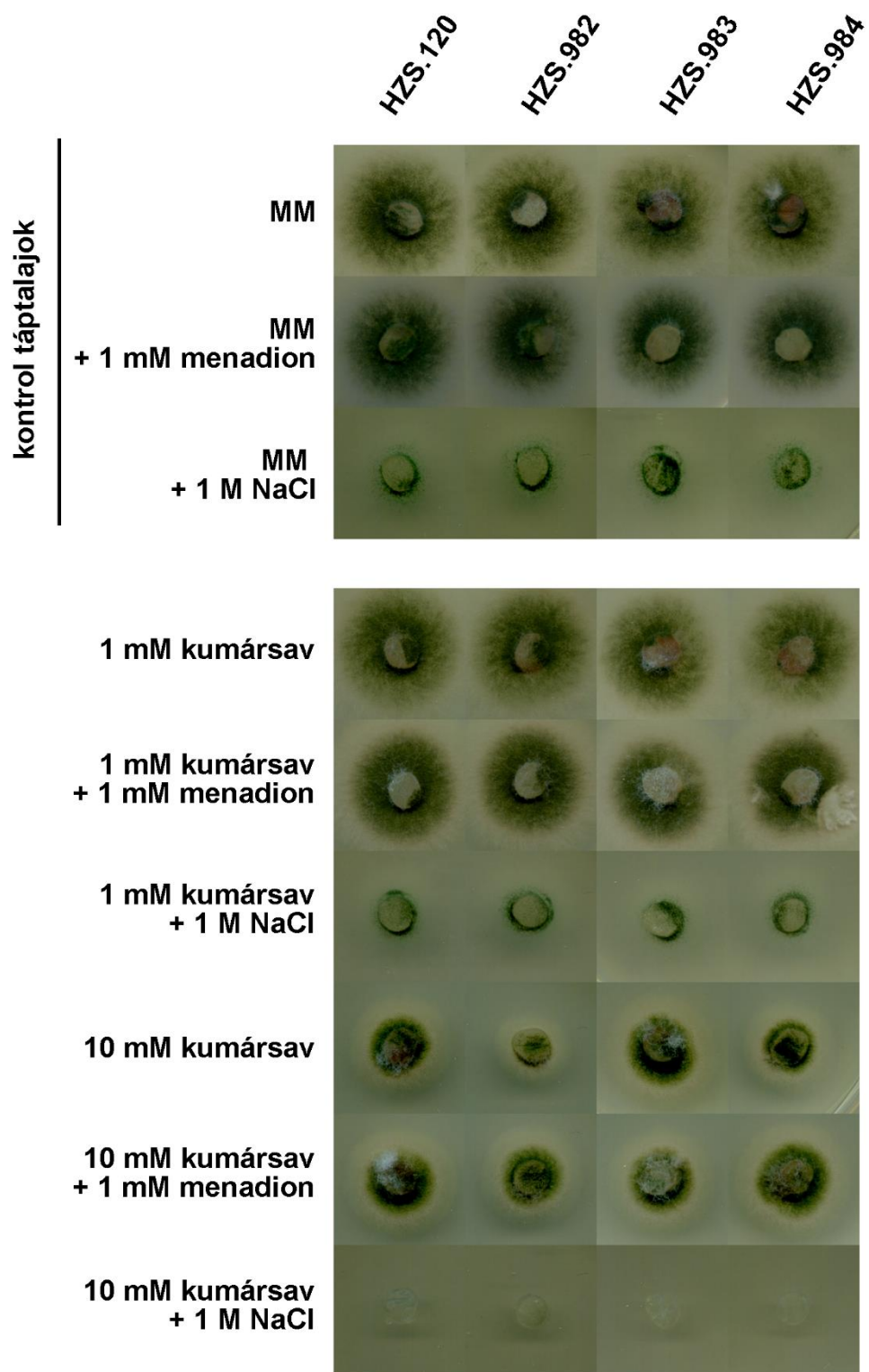
9. ábra: Vad és a deléciós törzsek növekedési vizsgálata minimál táptalajon (MM) ferulasav jelenlétében 1 mM menadion vagy 1 M NaCl stresszorokkal vagy azok nélkül. HZS.120: *lccC*⁺ kontrol; HZS.982-984: *lccCΔ* törzsek.



10. ábra: Vad és a deléciós törzsek növekedési vizsgálata minimál táptalajon (MM) kávéssav jelenlétében 1 mM menadion vagy 1 M NaCl stresszorokkal vagy azok nélkül. HZS.120: *lccC*⁺ kontrol; HZS.982-984: *lccCΔ* törzsek.



11. ábra: Vad és a deléciós törzsek növekedési vizsgálata minimál táptalajon (MM) klorogénsav jelenlétében 1 mM menadion vagy 1 M NaCl stresszorokkal vagy azok nélkül. HZS.120: *lccC⁺* kontrol; HZS.982-984: *lccCΔ* törzsek.



12. ábra: Vad és a deléciós törzsek növekedési vizsgálata minimál táptalajon (MM) kumársav jelenlétében 1 mM menadion vagy 1 M NaCl stresszorokkal vagy azok nélkül. HZS.120: *lccC*⁺ kontrol; HZS.982-984: *lccCA* törzsek.

A növekedési tesztek alapján elmondható, hogy egyetlen extracelluláris lakkáz gén delécioja nem okozott a vad típustól eltérő növekedési képességet a vizsgált fenolos vegyületeken és azok oxidatív és ozmotikus stresszorral történő kombinálása során. A kísérletek eredménye rámutatott arra is, hogy a jövőben optimalizálni kell az alkalmazott ozmotikus stresszor koncentrációját, mert az 1 M NaCl már önmagában erősen redukálja a gomba növekedését. A jövőben 1 M alatti koncentrációban fogjuk a NaCl-ot alkalmazni.

4.5. Az *lccC* gén metabolitprofiljának vizsgálata

A konídiospórák metanolos extraktumainak metabolitösszetételét pozitív és negatív ionizációs módban is vizsgáltuk. A Compound Discoverer szoftver, amellyel a nyers adatok előszűrését végeztük el, pozitív ionizációs módban 5192 vegyületet, negatív ionizációs módban 3755 vegyületet különített el. A mutánsra jellemző metabolitok kiszűréséhez olyan vegyületeket kerestünk, melyek legalább százszoros mennyiségben fordulnak elő a mutánsban. A következő táblázatban (7. táblázat) tüntettük fel azokat a metabolitokat, amelyek a feltételeknek megfeleltek.

7. Táblázat: A transzformánsokban legnagyobb mennyiségben fellelhető metabolitok

Molekula pontos tömege (g/mol)	Összegképlet	Retenciós idő (min)	Ionizációs mód
154,1111	C ₈ H ₁₄ N ₂ O	9,57	+
411,0823	C ₁₄ H ₂₁ NO ₁₁ S	7,65	-
511,3042	C ₂₉ H ₄₁ N ₃ O ₅	10,55	-
536,2998	C ₃₀ H ₄₀ N ₄ O ₅	11,46	+, -
536,2998	C ₃₀ H ₄₀ N ₄ O ₅	11,72	+, -
801,3357	C ₄₉ H ₄₉ N ₅ O ₂ P ₂	8,50	+

A transzformánsokban halmozódó 6 metabolitot a hozzáférhető adatbázisok segítségével nem tudtuk azonosítani. Két vegyület izomer, összegképletük, fragmentációs mintázatuk (MSMS spektrumuk) megegyezik, csak retenciós idejük tér el. Összegképletük alapján 3 vegyület nagyfokú telítetlenséget mutat (511,3042; 536,2998), sőt az 511,3042 pontos tömegű vegyület fragmentációs mintázata (MSMS spektrum) alapján feltételezhetően aromás szerkezetű.

5. ÖSSZEGZÉS ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az *A. nidulans* világszerte fellelhető különböző környezeti niche-ekben. Gyakran megtalálható talajban, bomló szerves anyagokban gazdag környezetben. A gombák genomjában, így az *A. nidulans*-ében is számos lakkázkódoló gén található, amelyek feltehetően génduplikációs eseményekből származnak, és különböző élettani szerepet töltenek be. Lokalizációjukat tekintve lehetnek intracelluláris és extracelluláris lakkázok. A *Basidiomycota*-k esetében az extracelluláris lakkázok teszik lehetővé a fa szubsztrátokon történő növekedési képességet, míg az *Ascomycota*-k körében az extracelluláris lakkázokat virulencia faktornak tekintik a növénypatogén gombák esetében. Az *A. nidulans* nem növénypatogén, mégis rendelkezik három extracelluláris lakkázzal (*LccB*, *LccC*, *LccD*). Hipotézisünk szertint ezen lakkázok a gomba növekedésére negatívan ható, környezetben előforduló növényi fenolos vegyületek semlegesítésére szolgálnak. Hogy ezt igazoljuk, célul tűztük ki az *A. nidulans lccB*, *lccC* és *lccD* tripla delécióját és a tripla deléciós törzs vizsgálatát, melyből jelen dolgozatban az *lccC* delécióját valósítottuk meg. A deléciót *A. nidulans riboB2*; *pabaA1*; *veA1* genotípusú törzsén végeztük el, melyhez háromkomponensű génszubsztitúciós kazettát hoztunk létre *A. fumigatus riboB* gén, mint szelekciós marker gén felhasználásával. Az *lccC* gént sikeresen deletáltuk, és három kiválasztott deléciós törzsön hajtottunk végre növekedési tesztet és metabolitvizsgálatot. A növekedési tesztek során 4 különböző növényi fenolos vegyülettel szemben vizsgáltuk a transzformánsok toleranciáját a recipiens kontrolhoz viszonyítva nem-kombinált és oxidatív-, valamint ozmotikus stresszorzal kombinált körülmények között. Ahogy azt elvártuk, egyetlen extracelluláris lakkáz hiánya nem okoz látható fenotípusváltozást fenolos és oxidatív-, vagy ozmotikus stresszorzal kombinált fenolos környezetben. A közeljövőben a hármas deléciós törzstől várjuk, hogy ezen vizsgált körülmények között a vad típusú kontrolhoz képest eltérő fenotípust mutasson. Érdekes módon az *lccC* deléciós törzsek konídiosóráinak metabolitprofiljának UHPLC-ESI-HRMS vizsgálata alapján 6 fenolos metabolit felhalmozódását mutattuk ki. Ez alapján valószínűsítjük, hogy az *LccC* intracelluláris szereppel is bír, amellet, hogy Mander és *mtsai*. kimutatták, hogy az enzim az extracelluláris térben megjelenik és ott képes a számára felvehető szubsztrátok átalakítására (Mander és *mtsai*., 2006). Az a tény, hogy az *lccCΔ* törzsek konídiospóráiban tapasztaltuk a metabolit felhalmozódást, arra utal, hogy az *lccC* gén valószínűleg a konídiogenezis során aktiválódik és fejeződik ki. Ezt a felvetést a jövőben konídiogenezis életszakaszból kivont RNS minták vizsgálatával tudjuk ellenőrizni és igazolni. A génkifejeződés igazolása és adott életszakaszhoz köthető, időzített megvalósulása új

távlatokat nyithat az LccC funkcióvizsgálataihoz (pl. gfp fúziós LccC lokalizációjának vizsgálata) és az *lccC* génműködés vizsgálatához (transzkripció faktor és ha van, inducer metabolit azonosítása). Ezzel párhuzamosan hangsúlyt fektetnénk a konídiospórákban felhalmozódó vegyületek szerkezetének meghatározására is, amelyet analitikai izolálást követő NMR vizsgálatokkal tudunk végrehajtani. Ezek a felhalmozódó vegyületek direkt, vagy indirekt módon kapcsolatban állnak az LccC enzimfunkciójával. Azonosításuk feltétlenül elősegíti az LccC élettani szerepének tisztázását.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Ansari, M.A., Anurag, A., Fatima, Z., Hameed, S.** 2013. Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent. *Microb Pathog Strateg Combat them Sci Technol Educ.* **1**, 1189-1195.
- 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. 10.1023/A:1018417917255.
- Aramayo, R., Timberlake, W.E.** 1993. The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. *The EMBO Journal* **12**, 2039–2048.
- Baldrian, P.** 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 215–242.
- Brown, D.W., Salvo, J.J.** 1994. Isolation and characterization of sexual spore pigments from *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 979–983.
- Chang, P.-K., Cary, J.W., Lebar, M.D.** 2020. Biosynthesis of conidial and sclerotial pigments in *Aspergillus* species. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 2277–2286.
- Chang, P.-K., Scharfenstein, L.L., Mack, B., Wei, Q., Gilbert, M., Lebar, M., and Cary, J.W.** 2019. Identification of a copper-transporting ATPase involved in biosynthesis of *A. flavus* conidial pigment. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 4889–4897.
- Chung, Y.S., Chae, K.-S., Han, D.M., Jahng, K.-Y.** 1996. Chemical composition and structure of hyphal wall of null-pigment mutant of *Aspergillus nidulans*. *Molecules and Cells* **6**, 731–736.
- Clutterbuck, A.J.** 1990. The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. *Journal of general microbiology.* **136**, 1731-8. 10.1099/00221287-136-9-1731.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, E.** 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol* **46**, 3774–3779.
- Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M.** 1975. Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia* **31**, 50–52.
- Hamari, Z., Amillis, S., Drevet, C., Apostolaki, A., Vágvölgyi, C., Diallinas, G., Scazzocchio, C.** 2009. Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **73**, 43–57.
- Hermann, T.E., Kurtz, M.B., Champe, S.P.** 1983. Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **154**, 955–964.
- Kevei, F., and Peberdy, J.F.** 1977. Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J Gen Microbiol* **102**, 255–262.

- Li, Q., Ge, L., Cai, J., Pei, J., Xie, J., Zhao, L.** 2014. Comparison of two laccases from *Trametes versicolor* for application in the decolorization of dyes. *J Microbiol Biotechnol* **24**, 545–555.
- Mander, G.J. Wang H, Bodie E, Wagner J, Vienken K, Vinuesa C, Foster C, Leeder AC, Allen G, Hamill V, Janssen GG, Dunn-Coleman N, Karos M, Lemaire HG, Subkowski T, Bollschweiler C, Turner G, Nüsslein B, Fischer R.** 2006. Use of laccase as a novel, versatile reporter system in filamentous fungi. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5020–5026.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I.** 2007. “Blue” laccases. *Biochemistry (Moscow)* **72**, 1136–1150.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.-M.** 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol* **90**, 494–507.
- Rivera-Hoyos, C.M., Morales-Álvarez, E.D., Poutou-Piñales, R.A., Pedroza-Rodríguez, A.M., Rodríguez-Vázquez, R., Delgado-Boada, J.M.** 2013. Fungal laccases. *Fungal Biol Rev* **27**, 67–82.
- Santhanam, N., Vivanco, J.M., Decker, S.R., Reardon, K.F.** 2011. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends Biotechnol* **29**, 480–489.
- Sapmak, A.** 2016. *Talaromyces marneffei* laccase modifies THP-1 macrophage responses. Virulence. **7**. 00-00. 10.1080/21505594.2016.1193275.
- Scazzocchio, C.** 2019. *Aspergillus*: A Multifaceted Genus, p. B9780128096338208030. Reference Module in Life Sciences. Elsevier.
- Scherer, M., Fischer, R.** 2001. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **199**, 207–213.
- Scherer, M., Fischer, R.** 1998. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* **170**, 78–84.
- Strong, P.J., Claus, H.** 2011. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **41**, 373–434.
- Zabka, M., Pavela, R.** 2013. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* **93**, 1051–1056.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszékén készíthessem el TDK dolgozatomat.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Hamari Zsuzsának és Dr. Varga Mónikának, amiért az elmúlt években irányították és támogatták munkámat. Köszönöm belém fektetett bizalmukat, és hogy minden segítséget megadtak munkám sikeres elvégzéséhez.