**AZ ELSŐ EUKARIÓTA NIKOTINSAV HASZNOSÍTÁSI ÚTVONAL
FELDERÍTÉSE, SZABÁLYOZÁSA ÉS ENZIMEINEK VIZSGÁLATA
ASPERGILLUS NIDULANS MODELLSZERVEZETBEN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

ÁMON JUDIT

TÉMAVEZETŐ:

DR. HAMARI ZSUZSANNA

EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

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

SZEGED

2018

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	6
2. Bevezetés	8
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség jellemzése.....	9
3.2. A nikotinsav, vagyis a B3-vitamin	10
3.3. A nikotinsav lebontás folyamata prokariótákban	11
3.4. Az eukarióta nikotinsav katabolikus útvonal feltárásának előzményei.....	14
3.4.1. A PHII enzimaktivitás felfedezése	14
3.4.2. A Moco enzimek általános jellemzői	15
3.4.3. A PHI és PHII genetikai és biokémiai jellemzői.....	16
3.5. A cink-ujj proteinek jellemzése és csoportosítása.....	19
3.6. Transzkripció faktorok aktivitásának szabályozása.....	21
3.7. Metabolikus útvonalak transzkripció faktorai, azok hatásmódja és intracelluláris lokalizációja <i>A. nidulans</i> -ban	23
3.7.1. AlcR: Az etanol felhasználási útvonal regulátora	23
3.7.2. PrnA: A prolin felhasználási útvonal regulátora	23
3.7.3. NirA: A nitrát hasznosítási útvonal regulátora	24
3.7.4. UaY: A purin felhasználási útvonal regulátora	25
3.8. Transzkripció faktorok nukleáris transzport mechanizmusai	26
3.8.1. Nukleáris import mechanizmus	26
3.8.2. Nukleáris export mechanizmus	28
3.8.3. Importin α független, alternatív transzport útvonal	28
4. Célkitűzés	29
5. Anyagok és módszerek.....	31
5.1. Alkalmazott mikroorganizmusok	31
5.2. A tenyésztés során alkalmazott táptalajok és táptalaj komponensek	31

5.3. Az <i>A. nidulans</i> tenyésztése során alkalmazott körülmények.....	32
5.4. Totál DNS kivonáshoz használt oldatok	33
5.5. Protoplasztáláshoz használt oldatok	33
5.6. Fehérje izoláláshoz használt oldat	33
5.7. Agaróz gélelektroforézishez használt oldat.....	33
5.8. Kompetens <i>E. coli</i> készítéséhez használt oldatok	34
5.9. Polimeráz láncreakció.....	34
5.10. DNS gélelektroforézis	35
5.11. PCR termékek tisztítása.....	35
5.12. Tisztított PCR termékek preparatív izolálása és vektorba ligálása.....	35
5.13. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek készítése	36
5.14. <i>E. coli</i> sejtek transzformálása	36
5.15. Plazmid DNS izolálás: "Mini Preparátumok" készítése.....	36
5.16. Plazmid DNS izolálás: "Maxi Preparátumok" készítése	36
5.17. <i>A. nidulans</i> transzformálás	37
5.18. Totál DNS kivonása <i>A. nidulans</i> -ból.....	37
5.19. Southern-hibridizáció	38
5.20. <i>A. nidulans</i> törzsek heterozigóta keresztezése.....	38
5.21. RNS kivonás <i>A. nidulans</i> -ból, cDNS szintézis.....	39
5.22. Kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	39
5.23. Kópiaszám meghatározás qPCR alkalmazásával	40
5.24. Mutagenézis kísérletek kivitelezése	40
5.25. Mutációk azonosítása szekvenálással; a <i>hxnP</i> és <i>hxnS</i> intron szekvenciáinak meghatározása	40
5.26. Enzim aktivitás vizsgálat	41
5.27. A klasztereződést mutató <i>hxn</i> gének deléciója	42
5.27.1. A <i>hxnS</i> gén deléciója a Chaveroc-féle eljárás szerint	42

5.27.2. A <i>hxnR</i> gén deléciója Chaveroco-féle eljárás szerint	43
5.27.3. A <i>hxnT/Y/Z/P</i> és <i>hxnR</i> gének deléciója Double-Joint PCR módszerrel.....	43
5.28. A <i>hxnR</i> rekonstitúciós törzsek elkészítése.....	46
5.29. A HxnR intracelluláris lokalizációjának vizsgálata	47
5.29.1. C-terminális GFP fúziós konstrukciók létrehozása	47
5.29.2. N-terminális GFP fúziós konstrukciók elkészítése.....	50
5.30. Mikroszkópos preparátumok készítése.....	51
5.31. <i>In silico</i> analízisek során felhasznált módszerek	52
6. Eredmények és értékelésük	53
6.1. A HxnS-t kódoló gén azonosítása	53
6.2. A PHI (HxA) és PHII (HxnS) összehasonlítása	55
6.3. A <i>hxnR/aplA</i> gén azonosítása és jellemzése	57
6.4. Egy szorosan konzervált génklaszter felfedezése a VI. kromoszómán	62
6.5. A <i>hxn</i> gének NA hasznosításban betöltött szerepe	66
6.6. A <i>hxn</i> gének deléciója Double-Joint PCR módszerrel létrehozott szubsztitúciós kazetta <i>A. nidulans</i> -ba transzformálásával	71
6.6.1. A <i>hxnZ</i> gén deléciója	71
6.6.2. A <i>hxnY</i> gén deléciója	72
6.6.3. A <i>hxnT</i> gén deléciója	73
6.6.4. A <i>hxnP</i> gén deléciója.....	73
6.6.5. A <i>hxnR</i> gén deléciója.....	75
6.7. A deléciós törzsek növekedési képességének vizsgálata különböző N-forrásokon .	76
6.8. A HxnR intracelluláris lokalizációjának vizsgálata <i>hxnR-gfp</i> fúziós konstrukciók kifejeztetésével és vizsgálatával	78
6.8.1. C-terminális <i>hxnR-gfp</i> konstrukciók vizsgálata.....	79
6.8.2. N-terminális <i>gfp-hxnR</i> fúziós konstrukciók vizsgálata.....	90
7. Összefoglalás	95
8. Summary.....	101

9. Köszönetnyilvánítás	106
10. Irodalomjegyzék	107
11. Mellékletek	116

1. Rövidítések jegyzéke

2,5-DP:	<u>2,5</u> -dihidroxipiridin
6-NA:	6-hidroxi-nikotinsav (<u>6</u> -hydroxyn <u>ic</u> otinic <u>a</u> cid)
acam:	<u>a</u> ce <u>t</u> a <u>m</u> i <u>d</u>
allp:	<u>a</u> llo <u>p</u> u <u>r</u> i <u>n</u> o <u>l</u>
AS:	<u>a</u> mi <u>n</u> o <u>s</u> a <u>v</u>
BLAST:	<u>B</u> a <u>s</u> i <u>c</u> <u>L</u> o <u>c</u> a <u>l</u> <u>A</u> l <i>ig</i> nment <u>S</u> e <u>a</u> r <u>c</u> h <u>T</u> o <u>o</u> l
bp:	bázis pár
cDNS:	komplementer <u>D</u> N <u>S</u> (<u>c</u> omplementary DNA)
chim:	kiméra (<u>ch</u> imera)
CM:	komplett táptalaj (<u>c</u> omplett <u>m</u> edium)
DIG:	<u>d</u> igoxigenin
DNS:	<u>d</u> e <u>z</u> oxiribon <u>u</u> k <u>l</u> e <u>i</u> n <u>s</u> a <u>v</u>
downst (<u>down</u>):	lentebbi (<u>d</u> own <u>s</u> tream)
EtBr:	<u>E</u> tí <u>d</u> ium- <u>B</u> romid
FMN:	<u>f</u> lavin- <u>m</u> onon <u>u</u> k <u>l</u> eotid
frw:	előre irányuló (<u>f</u> or <u>w</u> ard)
GFP:	zöld fluoreszcens fehérje (<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
hx:	<u>h</u> ipo <u>x</u> antin
kDa:	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
LB:	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani táptalaj
link:	összekötő (<u>l</u> in <u>k</u> er)
mCherry:	<u>m</u> ono- <u>C</u> herry
MM:	minimál táptalaj (<u>m</u> inimal <u>m</u> edium)
Moco:	piranopterin-molibdén kofaktor (pyranopterin- <u>m</u> olybdenum <u>c</u> ofactor)
mRNS:	hírvivő <u>R</u> N <u>S</u> (<u>m</u> essenger RNA)
mRNS:	<u>m</u> essenger RNA (hírvivő <u>R</u> N <u>S</u>)
NA:	nikotinsav (<u>n</u> icotinic <u>a</u> cid)
NAA:	nikotinsavamid (<u>n</u> icotinic <u>a</u> cid <u>a</u> mide)
NAD+:	<u>n</u> ikotinamid- <u>a</u> denin- <u>d</u> inukleotid, oxidált forma
NADH:	<u>n</u> ikotinamid- <u>a</u> denin- <u>d</u> inukleotid, redukált forma
NADP+:	<u>n</u> ikotinamid- <u>a</u> denin- <u>d</u> inukleotid-foszfát, oxidált forma

NADPH:	<u>n</u> ikotinamid- <u>a</u> denin- <u>d</u> inukleotid-foszfát, redukált forma
NES:	<u>n</u> ukleáris <u>e</u> xport <u>s</u> ignál
nest:	beágyazott (<u>n</u> ested)
NLS:	<u>n</u> ukleáris <u>l</u> okalizációs <u>s</u> ignál
NPC:	nukleáris pórus komplex (<u>n</u> uclear pore <u>c</u> omplex)
nt:	<u>n</u> ukleotid
OD:	<u>o</u> ptikai <u>d</u> enzitás
ORF:	nyitott leolvasási keret (<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
PCI:	fenol:kloroform:izoamilalkohol (<u>p</u> henol: <u>c</u> hloroform: <u>i</u> soamylalcohol)
PEG:	poli <u>e</u> tilén-glikol
Pfam:	fehérje család (<u>p</u> rotein <u>f</u> amily)
PHI:	purin <u>h</u> idroxiláz <u>I</u>
PHII:	purin <u>h</u> idroxiláz <u>II</u>
PMFS:	fenilmetilszulfonil-fluorid (<u>p</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luoride)
qRT-PCR:	valós idejű polimeráz láncreakció (<u>Q</u> uantitative <u>r</u> eal-time <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
rev:	visszafelé irányuló (<u>r</u> everse)
RFP:	vörös fluoreszcens protein (<u>r</u> ed <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
rpm:	fordulat per perc (<u>r</u> evolutions per <u>m</u> inute)
SDS:	Nátrium-dodecil-szulfát (<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
seq:	szekvenáló (<u>s</u> equencing)
SM:	<u>s</u> zacharózos <u>m</u> inimál táptalaj
SO:	<u>s</u> zulfát <u>o</u> xidáz
SSC:	nátrium-citrát és nátrium-klorid oldata (<u>s</u> aline, <u>s</u> odium <u>c</u> itrate)
TAE puffer:	<u>t</u> ris- <u>a</u> cetát- <u>E</u> DTA puffer
trf:	<u>t</u> ransz <u>f</u> ormáns
UA:	húgysav (<u>u</u> ric <u>a</u> cid)
upst (up):	fentebbi (<u>u</u> pstream)
UV:	<u>U</u> ltrayiola
XDH:	<u>x</u> antin <u>d</u> e <u>h</u> idrogenáz

2. Bevezetés

Annak ellenére, hogy számos olyan mikroorganizmus ismert, amelyek a nikotinsavat (NA) egyedüli nitrogénforrásként hasznosítani tudják, máig csak a prokarióta NA lebontási útvonalakat kutatták. Eukariótákkal kapcsolatban csak az vált ismertté, hogy létezik egy molibdenoprotein (purin hidroxiláz II, PHII) *Aspergillus nidulans* modellszervezetben, amely számos biokémiai jellemzőjében hasonló a purin katabolikus útvonal egyik kulcsenzimével, a purin hidroxiláz I-gyel (PHI). A PHII amellet, hogy a PHI-hez hasonlóan képes a hipoxantint szubsztrátként felhasználni és xantinná hidroxilálni, egyedi módon a NA-t is képes szubsztrátként kötni és azt 6-hidroxi-nikotinsavvá (6-NA) alakítani. Kimutatták azt is, hogy PHII enzimaktivitást csak akkor tudnak detektálni, ha a tápoldatban alkalmazott nem-represszáló nitrogénforrás mellé inducer mennyiségben NA-t, vagy 6-NA-t adagolnak.

Ezen úttörő ismeretek nyomán kutatócsoportunk elsőként kezdte el az *A. nidulans* eukarióta modellszervezetben a NA katabolikus útvonal feltárását. A disszertációban a PHII-t kódoló gén és az útvonal transzkripciós faktorát is hordozó 6 génből álló génklaszter kerül bemutatásra, amelynek reverz genetikai vizsgálatával előrevetítjük, hogy az *A. nidulans*-ban a NA katabolikus út a prokariótákban eddig megismert összes útvonaltól eltér. A prokariótáktól való különbözőség előre jelzi, hogy az eukarióta útvonalban azonosított enzimek valószínűleg újszerű biokonverziós aktivitással bírnak, amelyek számos új felhasználási lehetőséget nyújthatnak az ipari biotechnológia számára, illetve a gyógyszeripar és növényvédőszer gyártásban is versenyképes megoldást jelenthetnek a heterociklusos vegyületek olcsó, vegyszermentes biológiai átalakítására.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az *Aspergillus* nemzetség jellemzése

Kevés olyan gomba csoport létezik, ami olyan káros és olyan hasznos is egyben az ember számára, mint a több mint 200 fajt számláló *Aspergillus* nemzetség. Tagjai az aszkuszos fonalgombák (Ascomycota) Eurotiales rendjének Trichocomaceae (korábban Aspergillaceae) családjába sorolhatóak, amelyek különböző éghajlati viszonyokhoz alkalmazkodva világszerte elterjedtek (Kevei, 2010).

Mindennapi életünk során találkozhatunk velük a talajban, bomló biomasszában, épületek belterében, élelmiszer növényeken, szántóföldi-, illetve raktári kártevőként. Különböző toxinokat termelhetnek és esetenként fertőzéseket is okozhatnak (Gugnani, 2003), így az orvostudomány, a gyógyszeripar és a mezőgazdaság számára is nagy jelentőséggel bírnak. Az *Aspergillus*-ok az ipari fermentációs folyamatokban különösen fontosak. Az általuk termelt elsődleges metabolitokat, pl. citromsavat, glükonsavat és itakonsavat (*A. niger*, *A. terreus*) az élelmiszeriparban használják fel, de széles körben alkalmazzák a gombák cellulázait, amilázait, proteázait, lipázait és pektinázait is (Gugnani, 2003). Néhány általuk előállított másodlagos metabolit, pl. a lovasztatin, peptid antibiotikumok és penicillin a gyógyászatban töltönek be jelentős szerepet (*A. terreus*) (Ward, Qin és mtsai., 2005; Pansuriya és Singhal, 2010; Jaivel, 2010), míg mások negatív biológiai hatással bírnak, pl. a karcinogén aflatoxin (*A. flavus* és *A. parasiticus*) és sterigmatocisztin (*A. nidulans*, *A. versicolor*), a citotoxikus patulin (*A. clavatus*), valamint a súlyos vesekárosodást okozó ochratoxin (*A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius*) komoly egészségügyi kockázatot jelent a fertőzött termények állati és emberi fogyasztóira egyaránt (Gugnani, 2003; Wang, Lei és mtsai., 2016; Schroeder és Kelton, 1975).

Míg az *A. niger*, *A. oryzae* és *A. terreus* fajokat elsősorban a fermentációs iparágban alkalmazzák, addig az *A. nidulans*-t főleg a molekuláris sejtbiológiai kutatásokban használják. Modellszervezetként történő alkalmazása több mint 60 éves múltra tekint vissza, ami az alábbi tulajdonságainak köszönhető:

- metabolikus sokoldalúságának, ami a primer és szekunder metabolikus folyamatok széles választékával szolgál;
- fonalas növekedésének;
- teljes szexuális és vegetatív életciklusának;
- paraszexuális életciklusának;

- gyors növekedésének, amivel nagymennyiségű, tesztelhető biomasszát hoz létre néhány nap alatt;
- folyadékkultúrában történő tenyésztettségének;
- szilárd táptalajon mutatott kompakt növekedésének, ahol a telep átmérője, a hifasűrűség és a konídiospóra termelés azonnal és könnyen vizsgálható;
- a nagyszámban rendelkezésre álló auxotróf mutánsnak, amely a genetikai vizsgálatokhoz és a modern molekuláris biológiai eljárások kivitelezéséhez felbecsülhetetlen értékű;
- egymagvú konídiospóráinak, ami a klonális szaporodást és a mutánsok, transzformánsok és keresztezések során létrejött utódok gyors tisztítását teszi lehetővé;
- a homotallikus párosodási stratégiájának, ami miatt önkeresztezhető;
- haploid genomjának, ami miatt a mutánsok könnyen szelektálhatóak és a Mendeli analízis egy generáción belül elvégezhető;
- könnyen lehet diploidot és heterokariont létrehozni, ami lehetővé teszi a komplementációs analízist, a dominancia teszteket és mitotikus genetika alkalmazását;
- és könnyű transzformálhatóságának, ami a modern molekuláris biológiai eljárások használatát támogatja.

Az *A. nidulans* kutatás számos területen hozzájárult alapvető biológiai folyamatok megértéséhez, mint pl. génműködés és rekombináció; sejtciklus; DNS hibajavítás; katabolikus és bioszintetikus folyamatok és azok szabályozása; másodlagos metabolizmus (Goldman és Kafer, 2004; Denison és May, 1994; Osmani és Mirabito, 2004; Pontecorvo és mtsai., 1953). Teljes genomszekvenciája Monsanto és a Broad Institute együttműködése nyomán 2005-ben elérhetővé vált (www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/aspergillus-genome-projects) és mivel azon mikrobák közé tartozik, amelyek a NA-t nitrogénforrásként képesek felhasználni, alkalmas modellszervezetnek bizonyult a NA lebontási útvonal eukarióta útvonalának felderítéséhez.

3.2. A nikotinsav, vagyis a B3-vitamin

A NA vagy niacin, közismertebb nevén a B3-vitamin a piridin karbonsav származéka. Vitamernek tekinthető, mivel több, metabolikus tulajdonságai alapján rokon, szerkezetileg egymásból levezethető heterociklusos vegyület is ezt a nevet viseli. Legfontosabb képviselői a nikotinsav (piridin-3-karbonsav) és a nikotinsavamid (NAA) azonos vitamin aktivitást mutatnak vitaminhiányos biológiai rendszerben (Keresztesy, 1944). A niacin belső és külső

forrásból is folyamatosan pótlódik. Előbbi a triptofán aminosav (AS) enzimatisz átalakítása során, utóbbi a táplálkozással valósul meg, NA specifikus transzporterek révén (Kumar és mtsai., 2013; Xu és Jiang, 2015). A NA-t, más vízoldható vitaminhoz hasonlóan (pl. folsav, biotin, tiamin, riboflavin) a vastagbél mikroflórájának tagjai is képesek szintetizálni, a helyi kolonociták (vastagbél epitél sejtek) nagyon hatékony tápanyag felvételének köszönhetően pedig a test niacin homeosztázisának fenntartásához ezúton is hozzájárulnak (Said, 2011). Mind a NA, mind pedig a NAA NAD^+/NADH - illetve $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -vá alakulhat, amely koenzimek számos olyan metabolikus reakcióban vesznek részt, amelyek befolyásolják a sejtek redox állapotát, így tulajdonképpen az organizmus anyagcseréjének minden pontjához kötődnek pl. a glikolízis, a citromsav-ciklus, nukleinsavak és zsírsavak bioszintézise kapcsán (Kumar és mtsai., 2013; Ijichi és mtsai., 1966; Ikeda és mtsai., 1965). A vitamin, homeosztázisának optimalizálása esetén védelmet nyújt az Alzheimer-kór és az életkorral összefüggő kognitív hanyatlás ellen, de jól ismert a koleszterinszint csökkentő hatása is (Kumar és mtsai., 2013). A niacin és/vagy annak endogén prekursorának (a triptofán) hiányában pellagra nevű betegség alakulhat ki, ami jellemzően a nyálkahártyák gyulladásával, bőrelváltozásokkal, hasmenéssel és demenciával jár (Badawy, 2014).

Az N-heterociklusos, aromás vegyületeket nem csak a humán szervezet hasznosítja, de a prokarióták is, ahol szén- és nitrogénforrásként, gombák esetén pedig nitrogénforrásként szolgálhatnak. A 6-NA biológiailag aktív hatóanyagok előanyaga, ezért nemcsak a gyógyszeripar, de különböző peszticidek, vegyszerek és rovarirtó szerek prekursoraként az agrárpar számára is nélkülözhetetlen (Yang és mtsai., 2009). Az N-heterociklusos aromás vegyületek lebontását érintő biokémiai útvonalak olyan új, vagy szokatlan enzimaktivitásokkal és metabolikus köztermékekkel szolgálhatnak (pl. 6-NA és 2,5-dihidroxipiridin (2,5-DP)), amelyek toxikus környezetkárosító anyagok lebontásába vonhatók be, mint például a nikotin és hidroxipiridinek, vagy pedig farmakológiai és agrokémiai jelentőségük van (Jimenez és mtsai., 2008).

3.3. A nikotinsav lebontás folyamata prokariótákban

Az 1990-es évektől kezdve nőtt azon kutatások száma, amelyek az aromás heterociklusos gyűrűk mikrobák általi lebontására fókuszáltak, annak érdekében, hogy segítsék és költségkhatékonyabbá tegyék a gyógyszer- és növényvédőszer alapanyagok előállítását (Berry és mtsai., 1987; Nakano és mtsai., 1999; Yanisch-Perron és mtsai., 1985). Számos prokarióta mikroorganizmust azonosítottak már, amelyek képesek a NA egyedüli nitrogénforrásként való hasznosítására és intenzív kutatások eredményeképp három

katabolikus útvonalat tártak fel. Eukarióta szervezetben azonban még nem vizsgálták a NA katabolikus folyamatokat részletesen, holott egy-egy új útvonal az iparilag hasznosítható új enzimek potenciális tárházának tekinthető.

A NA-t a prokarióták nem csak nitrogénforrásként, de szénforrásként is felhasználják. A NA lebontás első lépése minden baktériumban a piridin gyűrű C₆ hidroxilációja 6-NA-vá, amely átalakítást a már jól jellemzett és az iparban elterjedten alkalmazott nikotinsav-dehidrogenáz végez (Yang és mtsai., 2009). A 6-NA utáni következő lépések nagyban a környezetben rendelkezésre álló oxigén mennyiségétől függenek (Alhapel és mtsai., 2006), így prokariótákban a lebontás különböző útvonalakon folytatódhat.

Az anaerob talaj baktérium *Eubacterium barkeri* a NA-t piruvát és propionsav végtermékekig bontja le a továbbiakban részletezett módon (1. ábra).

1. ábra: Nikotinsav fermentáció *E. barkeri*-ben

1: NA dehidrogenáz; 2: 6-NA reduktáz; 3: enamidáz; 4: 2-(hidroximetil)-glutarát dehidrogenáz; 5: 2-(hidroximetil)-glutarát dehidratáz; 6: 2-metilén-glutarát mutáz; 7: (R)-3-metil-itakonát izomeráz; 8: (2R,3S)-dimetil-malát dehidratáz; 9: (2R,3S)-dimetil-malát liáz (Alhapel és mtsai., 2006)

A NA-t egy szelén tartalmú, négy alegységes enzim, a nikotinsav-dehidrogenáz (*ndhF*, *ndhS* és *ndhL/ndhM* klaszterekbe rendeződött gének által kódolva) 6-NA-vá hidroxilálja. A 2. lépést a 6-NA-reduktáz katalizálja, amely során a 6-NA 1,4,5,6-tetrahidro 6-oxo-nikotinsavvá redukálódik. Ezt a köztesterméket egy enamidáz hidroxilálja ammóniává és (S)-2-formilglutaráttá. Ezután a 2-(hidroximetil)-glutarát dehidrogenáz által egy NADH függő redukció történik, amelynek terméke az (S)-2-(hidroximetil)-glutarát. Az (S)-2-(hidroximetil)-

glutarátot a 2-(hidroximetil)-glutarát-dehidratáz 2-metil-glutaráttá alakítja. A következőkben B¹²-függő 2-metilén-glutarát mutáz (R)-3-metil-itakonátot, az (R)-3-metil-itakonát izomeráz 2,3-dimetil-malátot, a (2R,3S)-dimetil-malát dehidratáz pedig (2R-3S)-dimetil-malátot hoz létre. A lebontás befejező momentumaként a (2R,3S)-dimetil-malát liáz működése révén piruvát és propionsav keletkezik. A nitrogénforrásként való hasznosítást az enamidáz reakció során felszabaduló ammónium biztosítja, míg a piruvát és a propionsav a továbbiakban szénforrásként szolgál (Alhapel és mtsai., 2006).

A NA lebontása az aerob *Pseudomonas putida* KT2440-ben is a NA hidroxilációjával kezdődik egy két komponensű dehidrogenáz (NicAB) által, amely során 6-NA jön létre. A 6-NA-t a 6-NA monooxygenáz (NicC) alakítja 2,5-DP-né (2. ábra). Egy Fe²⁺ függő dioxigenáz (NicX, 2,5-dihidroxipiridin dioxigenáz) a 2,5-DT-t N-formil-maleinsav-amiddá alakítja. Ennek a további módosítását fumársavvá és maleinsavvá a maleinsav-amid köztestermékeken keresztül a NicD (NFM deformiláz), NicF (maleamát amidohidroláz), és NicE fehérjék (maleinsav izomeráz) katalizálják (Jimenez és mtsai., 2008).

2. ábra: Aerob nikotinsav degradáció útvonala *P. putida*-ban

NicAB, NA dehidrogenáz (zöld); NicC, 6-NA monooxygenáz (kék); NicX, 2,5-dihidroxi-piridin dioxigenáz (piros); NicD, NFM deformiláz (sárga); NicF, maleamát amidohidroláz (narancs); NicE, maleinsav izomeráz (rózsaszín). A szaggatott vonalú nyíl a 2,5-DP gyűrű hasításának korábban feltételezett mechanizmusát jelöli (Jimenez és mtsai., 2008)

A NA egyedüli szén- és nitrogénforrásként történő hasznosítására a szintén aerob *Bacillus niacini* is képes (Nagel, 1990) (3. ábra). A lebontás során a NA-ból a nikotinsav dehidrogenáz által 6-NA keletkezik. A 6-NA hidroxilációjának (6-NA dehidrogenáz) terméke viszont nem 1,4,5,6,-tetrahidro 6-oxo-nikotinsav, sem pedig 2,5-DP, hanem egy harmadik féle intermedier, a 2,6-dihidroxi-nikotinsav. Egy oxidatív dekarboxiláció következtében létrejön a 2,3,6-trihidroxi-piridin, amelynek jelenlétét a 2,6-dipiridol gyűrű nem enzimatis oxidációja során keletkező kék pigment megjelenése kíséri (Ensigns, 1964). A lebontás feltételezhetően a *Pseudomonas*-nál leírtakhoz hasonló módon folytatódik, amely enzimatis reakciók végén N-formil-maleinsav-amid, és maleinsav köztestermékeken keresztül végül maleinsav és fumársav keletkezik.

3. ábra: Nikotinsav degradáció feltételezett útvonala *B. niacini*-ben

Az aerob lebontás során 2,3,6-trihidroxipiridin intermedier jön létre, amely a továbbiakban vélhetően a *Pseudomonas*-nál leírtakhoz hasonló módon folytatódik, amely enzimatikus reakciók végén N-formil-maleinsav-amid, és maleinsav köztitermékeken keresztül végül maleinsav és fumársav keletkezik (Ensigns, 1964)

3.4. Az eukarióta nikotinsav katabolikus útvonal feltárásának előzményei

3.4.1. A PHII enzimaktivitás felfedezése

Az 1960-as és '70-es években Scazzocchio és munkatársai a purin degradációs útvonal feltárása közben rájöttek arra, hogy az eukarióta fonalas gomba, az *A. nidulans* modellorganizmusban a hipoxantin xantinná történő átalakítását a PHI enzim mellett egy másik enzim is el tudja végezni. Sikertelenül olyan törzseket szelektálniuk, amelyek a PHI xantin-dehidrogenáz struktúrgénjében mutációt hordoznak (Glatigny és Scazzocchio 1995; Glatigny és mtsai., 1998) és ennek ellenére az indukernyi mennyiségű NA-val kiegészített táptalajon képesek a hipoxantint nitrogénforrásként hasznosítani (Scazzocchio 1973; Darlington és Scazzocchio, 1968), mégpedig a PHII enzim révén. Az újonnan felfedezett PHII azonban nem indukálható húgysavval (a purin lebontási útvonal metabolikus indukere, 3.4.3. alfejezet) mint a PHI, csak NA vagy 6-NA jelenlétében aktiválódik (3.4.3. alfejezet) (Scazzocchio és mtsai.,

1973; Scazzocchio, 1994). A PHI-el ellentétben a PHII nem képes a xantint szubsztrátként felhasználni és húgysavvá alakítani (3.4.3. alfejezet). A PHI gátlása vagy vesztese során a NA inducer jelenlétében tapasztalt növekedés eredményeként egy alternatív purin degradációs útvonalat fedeztek fel. Az alternatív útvonalban a NA által indukált PHII katalizálja a hipoxantin xantinná történő hidroxilációját, míg a xantin további átalakítása húgysavvá egy α -ketoglutarát-függő xantin dehidrogenáz enzimnek (XanA, alternatív enzim) köszönhető, amely húgysavval indukálható (Sealy-Lewis és mtsai., 1978). A PHII enzimaktivitás felfedezése mellett genetikai munkák során olyan mutánsokat is azonosítottak, amelyek hipoxantin nitrogénforráson nem tudtak nőni PHI gátló allopurinol és inducer mennyiségű NA jelenlétében, valamint elvesztették NA hasznosítási képességüket, azonban egyedüli nitrogénforrásként alkalmazott 6-NA-n tudtak nőni (PHII struktúrgén mutánsok) (Scazzocchio, 1973; Darlington és Scazzocchio, 1968).

3.4.2. A Moco enzimek általános jellemzői

A molibdén (Mo) minden biológiai rendszer számára alapvető fontosságú elem, mivel a szén-, nitrogén- és kén metabolizmusában részt vevő kulcs enzimek (metalloenzimek) működésének esszenciális eleme. Önmagában biológiailag inaktív mindaddig, amíg egy speciális kofaktorról, pterinnel komplexet nem képez, létre hozva ezzel a piranopterinnal molibdén kofaktort (Moco), ami az összes Mo-enzim aktív centrumát alkotja (Mendel és Bittner, 2006). Több mint 50 Moco enzim található a természetben, amiből a legtöbbet bakteriális szervezetekben írtak le, ezzel szemben eukariótákban mindeddig csak hatot azonosítottak, amelyeket 2 osztályba sorolhatunk: a xantin oxidázok és a szulfát oxidázok családjára (Mendel és Bittner, 2006). A xantin oxidázok legjelentősebb képviselői a xantin dehidrogenázok (XDH), aldehid oxidázok, piridoxál oxidázok és nikotinsav hidroxilázok, míg a SO-ok a szulfát oxidázok és nitrát reduktázok csoportjából áll. Minden Mo-enzimnek, kivéve a növényi szulfát oxidázokat, szüksége van legalább még egy redox aktív központra, amik közül sokan vasat tartalmaznak az elektron szállításához. A xantin dehidrogenázoknak és az aldehid oxidázoknak (a nitrát reduktázoknak és szulfát oxidázoknak nem) szükségük van arra, hogy Mo-helyük poszt-transzlációs folyamat során szulfurilálódjon, ezáltal válnak aktívvá (Mendel és Bittner, 2006).

A XDH-ok a purin lebontási útvonal kulcs enzimek, amelyek oxidálják a hipoxantint xantinná és xantint a húgysavvá, ezzel egyidejűleg elektront szabadítanak fel a szubsztrátról (Mendel és Bittner, 2006). Az enzim homodimer formájában aktív, ami két azonos, körülbelül 150 kDa alegységből áll, amelyek mindegyike három doménre oszlik: egy 20 kDa nagyságú

N-terminális domén, ami két [2Fe-2S] klaszter kötésére szolgál; egy 40 kDa domén, ami a FAD-kötő helyet hordoz; és egy C-terminális domén, ami szükséges a Moco-kötéshez és a dimerizációhoz (Mendel és Bittner, 2006). A Mo-centrum szubsztrát hidroxilációja során felszabaduló elektron, a Fe-SII és a Fe-SI-n keresztül a flavin kofaktorra helyeződik át. A FAD helyen lévő elektron NAD^+ -ra kerül és NADH-t hoz létre.

3.4.3. A PHI és PHII genetikai és biokémiai jellemzői

Kiderült, hogy azon törzsek, amelyek a *cnx* (*cnxABC*, *cnxE*, *cnxF*, *cnxG* és *cnxH*) vagy *hxB* génjükben mutációt hordoznak, nem képesek hasznosítani sem a hipoxantint sem a NA-t. A *cnx* gének ugyanis olyan fehérjéket kódolnak, amelyek a xantin dehidrogenázok, a nitrát reduktázok és a szulfid oxidázok (Pateman és mtsai., 1964) közös kofaktorának, a piranopterín-molibdén kofaktornak (Moco) a szintéziséhez szükségesek, a HxB protein pedig (egy alkalmas elektron-akceptor pl. NAD^+ jelenlétében) katalizálja ezen enzimek aktív centrumában lévő MoVI terminális szulfurilációját (Lewis és mtsai., 1978; Scazzocchio, 1980), így esszenciális a xantin dehidrogenáz enzimsz csoport aktivitásához (Amrani és mtsai., 2000). Ebből adódott a felfedezés, miszerint mind a PHI és a PHII egy Moco közös kofaktorról rendelkeznek, aminek éréséhez, így aktivitásukhoz is ugyanazon gének működése szükségesek (*cnx*, *hxB*).

Mint ahogy azt a 3.4.1. alfejezetben említettük, a PHI és PHII szubsztrátspecifitása átfedést mutat. Mind a PHI, mind pedig a PHII katalizálja a hipoxantin (6-hidroxi-purin) xantinná (2,6-dihidroxi-purin) történő hidroxilálását, azonban a PHI a xantin további átalakítására is képes és húgysavat (2,6,8-trihidroxi-purin) hoz létre. A PHII ezzel az utóbbi enzimaktivitással már nem rendelkezik, azonban szert tett egy másik szubsztrátra, a NA-ra, amelyet 6-NA-vá hidroxilál, és ezzel egyben a NA katabolikus út első lépését katalizálja (Scazzocchio és mtsai., 1973; Lewis és mtsai., 1978; Coughlan és mtsai., 1984). A PHI és a PHII allopurinol és oxipurinol érzékenységekben eltér egymástól. Az allopurinol a PHI kompetitív gátlását okozza, míg analógja, az oxipurinol az enzim nem-kompetitív gátlószere. A PHII-re mindkét anyag pseudo-irreverzibilis gátló hatást fejt ki. A PHII számos biokémiai jellemzőjében nagy hasonlóságot mutatott a PHI enzimmel (1. táblázat) (Lewis és mtsai., 1978). Mindkettő molekulamérete és izoelektromos pontja közel azonos mérettartományba esik: a PHI 30 kDa, pI-ja 5,93, a PHII 32 kDa és pI-ja 5,91.

1. táblázat: A PHI és PHII tulajdonságainak összegzése a szakirodalmi adatok alapján. A teljes fehérjekivonatban lévő enzimekre vonatkozó (PHI, PHII) adatok Lewis és munkatársai írásából származnak (Lewis és mtsai., 1978), míg a tisztított enzimekre vonatkozóak Mehra-tól és Coughland-tól (Mehra és Coughlan, 1989; Coughlan és mtsai., 1984).

Szubsztrát	PHI (HxA)				PHII (HxNS)			
	Teljes fehérje kivonat		Tisztított enzim		Teljes fehérje kivonat		Tisztított enzim	
	R ráta	K (μM)	R ráta	K (μM)	R ráta	K (μM)	R ráta	K (μM)
Hipoxantin (6-hidroxi-nikotinsav)	1.0	51.2	1.00	16.4	1.00	90.4	1.00	116
Xantin (2,6-dihidroxipurin)	0.63	161.9	0.61	34.2	-	350*	<0.02	-
2-hidroxipurin	0.59	28.3	0.49	16.8	0.38	36.2	0.42	37
Allopurinol (4-hidroxipirátol-(3,4-d)piridin)	<0.005	-	0.007	-	0.006	0.5	0.007	1*
Nikotinsav	-	-	-	-	0.16	189	0.22	64

*-gal jelölve: a kompetitív inhibitor hipoxantin szubsztrát jelenlétében mért K_{is} (inhibitor disszociációs állandó) értéke. R ráta: a hipoxantinra vonatkoztatott relatív ráta, ahol 1-nek vették a 2,5 μM-nál mért K_m értéket.

A leglényegesebb különbség a két enzim között a szabályozásukban mutatkozik (4. ábra). A PHI génje (*hxA*) a húgysavval indukálható *uaY* transzkripció faktor szabályozása alatt áll, amely a purin hasznosítási útvonal specifikus transzkripció faktora (Scazzocchio és mtsai., 1982; Suarez és mtsai., 1995; Galanopoulou és mtsai., 2014). A PHII neutrális nitrogénforrásokon (pl. urea, acetamid és nitrát) történő nevelés során csak akkor mutatható ki, ha a tápközegbe inducer mennyiségben (1 mM) NA-t vagy 6-NA-t adagolunk, de a micéliumok nitrogénéheztetése alatt is kimutatható az enzimaktivitás (Scazzocchio, 1973). Már az 1970-es években felvetették annak a lehetőségét, hogy az enzim valódi inducere tulajdonképpen nem maga a NA, hanem a NA hidroxilációjának terméke, a 6-NA és/vagy a NA hasznosítási útvonal egy későbbi produktuma (Sealy-Lewis és mtsai., 1979). A PHI és PHII indukciós mintázata alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a PHII nem a purin hasznosítási útvonal, hanem a NA hasznosítási útvonal szabályozása alatt áll (4. ábra). Tulajdonságaik alapján összességében a PHI egy tipikus xantin dehidrogenáz, ezzel ellentétben a PHII a XDH csoporton belül egyedi sajátosságokkal rendelkezik. Mindezeket figyelembe véve azt feltételezték, hogy a PHII a PHI struktúrgénjének duplikációja, illetve divergens evolúciója során jöhetett létre (Scazzocchio és mtsai., 1973; Sealy-Lewis és mtsai., 1978).

4. ábra: A purin és a NA hasznosítási útvonal közötti kapcsolat bemutatása

A PHI egy xantin dehidrogenáz, ami katalizálja a hipoxantin xantinná, valamint a xantin húgysavvá alakulását. Két 2Fe(II)/2S klaszterből, FAD-kötő doménből és egy molibdopterin kofaktorból áll (Cultrone és mtsai., 2005).

A XanA egy α -ketoglutarát függő xantin dioxigenáz, ami szubsztrátként tudja hasznosítani a xantint, a hipoxantint viszont nem. A purin hasznosítási útvonal (Gournas és mtsai., 2011) végén a húgysav számos köztiterméken keresztül ammóniummá alakul. A PHII molibdén kofaktort (Moco) hordozó enzim, amely a hipoxantint xantinná és a NA-t 6-NA-vá hidroxilálja, de a xantin-húgysav átalakításra nem képes. Mivel a NA nitrogénforrásként hasznosul, valószínűleg a nitrogén metabolizálásra kerülő végső formája az ammónium lesz.

A '60-'70-es években végzett kísérletek során létrehozott mutánsok közül néhány napjainkig fennmaradt a mutánsokat létrehozó Prof. C. Scazzocchio törzsgyűjteményében. Ezeket három kategóriába lehet sorolni. Azok, amelyek nem nőnek allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalajon és NA-n, de nőnek 6-NA-n a PHII mutánsok csoportja (*hxnS29*, *hxnS35* és *hxnS41*). Amelyek nem nőnek allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalajon, NA-n és 6-NA-n sem, azok a vélhető regulátor (HxnR) mutánsok csoportja (*hxnR2*). Végül azok a mutánsok, amelyek allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalajon nőni tudnak NA inducer jelenléte nélkül a konstitutív mutánsok (*aplAc7*). Ezeket a mutánsokat Prof. C. Scazzocchio a rendelkezésünkre bocsájtotta és néhány munkatársa a laborunk közreműködésével együtt megtette az első lépéseket a NA katabolikus útvonal genetikai hátterének és szabályozásának feltárásához.

A Cereon Genomics Aspergillus Sequencing Project keretében (Broad Institute Aspergillus weboldalon) 2005-ben elérhetővé vált a teljes *A. nidulans* genom szekvencia, amely átvizsgálása során Prof. C. Scazzocchio és munkatársai azonosítottak egy olyan nyitott leolvasási keretet (ORF-et), ami nagyfokú azonosságot (51%) mutatott a PHI-et kódoló *hxA* génnel. A fentiekben említett PHII mutáns csoport elnevezése alapján a *hxA* homológ gént

hxnS-nek neveztük el (Ámon és mtsai., 2017). A *hxnS* a HxA-tól (1363 aminosav) 33 aminosavval hosszabb, 1369 aminosavból álló proteint kódol. A HxnS monomer feltételezett molekula tömege 153.170,72 Da, izoelektromos pontja 5,91, a HxA 149.523,49 Da, izoelektromos pontja 5,93 (Ámon és mtsai., 2017). Ezek az adatok összhangban vannak a natív dimerek kísérletileg meghatározott molekula méretével (304.000 és 327.000 Da) (Sealy-Lewis és mtsai., 1978), és azzal, hogy a HxnS lassabb migrációs képességeket mutat natív akrilamid gélen. Prof. C. Scazzocchio és munkatársai a *hxA* homológot (*hxnS*) hordozó VI. kromoszóma kozmid könyvtárából származó pLORIST2 kozmidot (Prade és mtsai., 1997) *hxnS41* és *hxnR2* mutánsba transzformálták és teljes fenotípus komplementációt tapasztaltak (Ámon és mtsai., 2017). A PHII és HxnR kategóriájú mutánsok alléljainak rekombinálódását vizsgáló klasszikus genetikai elemzésekkel a '70-es években már kimutatták, hogy erős kapcsoltság van a PHII és HxnR-t kódoló gének között, és ezt az erős kapcsoltságot a kozmid komplementáció alátámasztotta (Ámon és mtsai., 2017). A későbbiek során munkacsoportunk a Scazzocchio-féle csoporttal közösen végzett génkiütést a *hxnS*-en, majd a teljes kutatási vonal átkerült munkacsoportunkhoz.

3.5. A cink-ujj proteinek jellemzése és csoportosítása

A cink-kötő fehérjék a transzkripció szabályozók egyik legnagyobb családját alkotják eukariótákban, változatos másodlagos szerkezet megjelenésével és hatalmas funkcionális sokszínűséggel (MacPherson és mtsai., 2006). Nevüket a család elsőként felfedezett tagjának ujszerű alakjáról kapták (*Xenopus*, TFIIIA) (MacPherson és mtsai., 2006). Míg más fehérje családok kizárólag aminosav részekből épülnek fel, addig a cink-ujjak doménjei olyan hurkokból formálódnak, amelyekben egy α -hélixet és több, antiparalell β -redőt egy vagy több, struktúrális szerepet betöltő cink tart össze (Cooper, 2000). A cink ionokat cisztein és hisztidin aminosavak kötik meg, és olyan hurkolt szerkezetekbe ("ujjakba") csomagolják őket, amelyek a DNS-hez kötődnek (5. ábra, A panel). Ez stabilizálja a domént és hozzájárul a megfelelő fehérje szerkezet és funkció kialakulásához (MacPherson és mtsai., 2006). A szupercsalád tagjai azonban fehérje-fehérje kölcsönhatások közvetítésében, kromatin remodelling-ben, lipid kötések kialakításában, cinkérzékelésben is szerepet vállalnak, valamint a chaperon-ok munkáját is segíthetik (Laity és mtsai., 2001).

5. ábra: Az eukarióta transzkripció faktorok csoportosítása DNS-kötő doménjük alapján

A. Cink-ujjak: egy α -hélixet és több, antiparalell β -redőt egy vagy több, strukturális szerepet betöltő cink tart össze. B. Hélix-kanyar-hélix: 2 (homeodomének esetén 3), egymással 120° -os szöget bezáró α -hélix-ből és az őket összekötő rövid, 4 aminosavnyi hajlatból állnak. C. Leucin cipzár: minden 7. aminosava leucin, amelyek a spirál ugyan azon oldalára lokalizálódnak, így két, párhuzamosan futó, jobbmenetes α -hélix között hidrofób kölcsönhatások jöhetnek létre (dimerizálódás). Ezt a struktúrát bázikus aminosavakban (lizin és arginin) gazdag régió követ. D. Hélix-hurok-hélix: egy hosszabb, körülbelül 15 aminosavból álló, jellemzően 6 bázikus aminosavat tartalmazó α -hélixből, és egy rövidebb, hidrofób régiókból felépülő dimerizációs doménből állnak, amelyeket különböző hosszúságú hurkok köthetnek össze (Jin és mtsai., 2011; Cooper, 2000).

A cink-kötő motívum szerkezete, illetve az egyedülálló és nagymértékben konzervált konszenzus aminosavszekvenciák alapján a családot eukariótákban eddig három osztályba sorolták. Az I. osztály a gyakran csak klasszikus cink-ujjnak nevezett, Cys₂His₂ (C₂H₂) fehérjék csoportja. Specifikus pozíciókban, az "ujj hegyén" (az α -hélix N-terminális végén) két cisztein és két hisztidin aminosav található, amik a szerkezet stabilizálása érdekében megkötik a cinket, és részt vesznek a DNS felismerésben is. Az eukarióták körében a legelterjedtebb transzkripció faktor típus, amik monomerként kötődnek a DNS-hez. Kettő vagy több ismétlődő cink-ujj egységeinek mindegyike, Cys-X₂-4-Cys-X₁₂-His-X₃-5-His konszenzus aminosav szekvenciát hordoz, amik 1 cink atomhoz kötődnek (pl. NsdC, SteA, FlbC az *A. nidulans*-ban) (MacPherson és mtsai., 2006). A II. osztály Cys₄ (C₄) fehérjéi, mint pl. a GATA faktorok (pl. AreA, NsdD az *A. nidulans*-ban), a Cys-X₂-Cys-X_n-Cys-X₂-Cys-X_n-Cys-X₂-Cys-X_n-Cys-X₂-Cys szekvenciákon keresztül kötődnek az úgynevezett GATA motívumokhoz ((A/T)GATA(A/G)). Az előző csoporttól eltérően 1 cink-ujj egységgel, homo- vagy heterodimerként kapcsolódnak a DNS-hez (Urnov, 2002; Laity és mtsai., 2001). A III. osztály DNS-kötő doménjének 6 ciszteinjét 2 cink atom stabilizálja, így nevük cink-klaszter, cink binukleáris klaszter, Zn(II)₂Cys₆ vagy (Zn₂C₆) fehérjék. Egyedülállóak abban a

tekintetben, hogy 1 cink-ujj egységük nem 1, hanem 2 cink atomhoz kötődik. Szigorúan gombákban előforduló fehérjék. Monomerként, homo- és heterodimerként egyaránt interakcióba léphetnek a nukleinsavakkal. A legismertebb cink-klaszter protein a *Saccharomyces cerevisiae* Gal4p transzkripciós faktora (Lohr és mtsai., 1995; Schjerling és Holmberg, 1996; MacPherson és mtsai., 2006), de ilyenek például az *A. nidulans* NirA, AlcR, PrnA és UaY regulátorai. Konszenzus szekvenciája: Cys-X2-Cys-X6-Cys-X5–12-Cys-X2-Cys-X6–8-Cys (Caddick és mtsai., 1994; Wilson és Arst, 1998; Scazzocchio, 2000; Nikolaev és mtsai., 2003; Pokorska és mtsai., 2000; Suarez és mtsai., 1995; Cecchetto és mtsai., 2012; Liu és Marzluf, 2004; Galanopoulou és mtsai., 2014; Oestreicher és Scazzocchio, 1995).

3.6. Transzkripciós faktorok aktivitásának szabályozása

A prokarióták és eukarióták számos stratégiát fejlesztettek ki a transzkripciós faktorok megfelelő időben történő aktiválódásának szabályozására. Prokarióták esetében a transzkripció sebessége főként a rendelkezésre álló tápanyagok minőségétől és mennyiségétől függően változik. A szintézis aktivátor vagy represszor fehérjék által valósul meg. Arabinóz operon esetén, aktivátor fehérje jelenlétében történik meg az operonba rendeződött, arabinóz hasznosításához szükséges struktúrgének átírása (Schleif, 2010), míg a laktóz operon szabályozásánál csak az operátorhoz kötött represszor fehérje kizorításával indulhat meg ez a folyamat (Jacob és Monod, 1961). Néhány aminosav szintézise folytán (triptofán operon) a képződő végtermék gátolja a saját átíródását, mivel a represszor fehérjéhez kötve lehetővé teszi a gátló fehérje operátor szekvenciához való kapcsolódását, ami megakadályozza a transzkripciót (Fisher és mtsai., 1985). Prokariótákban a transláció már a transzkripció befejeződése előtt megkezdődik, így ezek a szervezetek kifejlesztettek egy módszert (attenuáció), aminek során az időközben elegendő mennyiségben képződött fehérje transzkripcióját a transláció sebessége, illetve az átíródó mRNS másodlagos szerkezete (attenuátor szekvenciák) is leállíthatja (Fisher és mtsai., 1985).

Eukariótákban a sejtmag megjelenésével nukleáris import és export mechanizmusok is fontos szerepet kaptak a transzkripciós faktorok target génekhez való hozzáféréseinek korlátozásában, így az egyik leghatékonyabb módjává váltak annak, hogy a sejt a génexpressziót a saját igényeihez igazítsa (Turpin és mtsai., 1999; MacPherson és mtsai., 2006). A transzkripciós faktorok sejtmagba szállítása szigorú kontroll alatt áll, pl. külső ingerek, a sejtciklus vagy fejlődési stádium által (Vandromme és mtsai., 1996), bár a pontos mechanizmus, amivel ez lehetővé válik, még kevésbé tisztázott. A nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) rendelkező transzkripciós faktorok nukleáris importja általában a

magmembránt áttörő nukleáris pórus komplexeken (NPC) keresztül, szolubilis transzport receptorok segítségével zajlik (3.8.1. pont) (pl. NirA *A. nidulans*-ban, Bernreiter és mtsai., 2007). A szállítandó fehérje közvetlen poszttranszlációs módosítása, nukleáris lokalizációs szignáljának "elfedése", vagy szállító fehérjéjének leköttetése mind befolyásolja a fehérje és a receptor közötti kölcsönhatást, a transzportfolyamatot és végső soron a génszabályozást (Vandromme és mtsai., 1996). Vannak olyan transzkripciós faktorok is, amelyek folyamatosan a sejtmagban helyezkednek el, lokalizációjukat nem befolyásolják indukáló vagy represszor hatások (pl. AlcR, PrnA, UaY *A. nidulans*-ban, Nikolaev és mtsai., 2003; Pokorska és mtsai., 2000; Galanopoulou és mtsai., 2014). A *S. cerevisiae* prolin hasznosítását szabályozó regulátora (Put3p) esetén kimutatták, hogy a fehérje mindig a promóteréhez kötött, aktiválódása azonban prolinnal való közvetlen kapcsolat révén szabályozott (Sellick és Reece, 2003). Hasonlóan a Put3p-hez, a Leu3p is folyamatosan a leucin bioszintézis gének promóteréhez kapcsolódik, de aktivvá csak akkor válik, ha a leucin prekursora is jelen van, míg a Ppr1p, a pirimidin bioszintézis gének aktivátora mindaddig inaktív, míg egy metabolikus köztesterméke vagy egy effektor molekula nem aktiválja (MacPherson és mtsai., 2006).

Számos transzkripciós faktor foszforiláció, vagy defoszforiláció útján aktiválódik (MacPherson és mtsai., 2006). Azonosítottak olyan géneket (pl. a glukoneogenezisben részt vevő gének aktivátorai), amelyek a target génjeik derepresszálása során foszforilálódnak (Cat8p) (Sellick és Reece, 2003), másokat a glükóz szénforrás (Rgt1p) (Flick és mtsai., 2003), vagy külső stressz (War1p- gyenge sav stressz) indukál (Kren és mtsai., 2003). Ezekkel ellentétben az *A. nidulans aflR* génje foszforiláció következtében inaktiválódik (Shimizu és mtsai., 2003). Egyes fehérjék promóterhez kapcsolódását olyan külső tényezők befolyásolják, amelyek a célgénekhez való kötődés fokozódását eredményezik (Larochelle és mtsai., 2006).

Az eukarióta DNS szoros nukleoszómás szerkezetbe van csomagolva, így a transzkripciós gépezet számára a gének nehezen hozzáférhetőek, gyakorlatilag inaktívak (MacPherson és mtsai., 2006). Számos transzkripciós faktor a kromatin remodelling komplexek (SWI, ISWI), hiszton módosító enzimek (pl. ubiquitinálás, CreA *A. nidulans*-ban), és/vagy transzkripciós kofaktorok (*A. nidulans*-ban AreA, (Muro-Pastor és mtsai., 1999)) segítségével igénylik cél génjeik átírásának megvalósulásához.

3.7. Metabolikus útvonalak transzkripció faktorai, azok hatásmódja és intracelluláris lokalizációja *A. nidulans*-ban

3.7.1. AlcR: Az etanol felhasználási útvonal regulátora

A. nidulans esetében az etanol hasznosítási útvonal génjeinek transzkripció szintjét egy specifikus aktivátor, az AlcR szabályozza. NLS-ja az N-terminális szekvencia első 75 aminosaván belül helyezkedik el, ami 5 bázikus aminosavban gazdag klaszterből áll, és átfedést mutat a DNS-kötő doménnel. Ebből az 5 régióból a fehérje intracelluláris lokalizációjának tanulmányozás során az első kettő alapvető fontosságúnak bizonyult mind a nukleáris lokalizáció, mind pedig az AlcR-specifikus DNS targetek felismerésében. A vizsgálathoz a kutatók *alcR* natív promóterrel kifejeztetett *alcR-gfp* konstrukciót hoztak létre (C-terminális) (Nikolaev és mtsai., 2003). A konstrukciót 1 kópiában hordozó transzformánsok növekedés során acetaldehid indukció hatására komplementálták a befogadó törzs fenotípusát, de mikroszkópos vizsgálatok során a termelt fehérje szintje a detektálhatóság határán volt, amit a fúziós protein alacsony expressziós szintje, és/vagy instabilitása okozhatott. A könnyebb vizsgálhatóság érdekében a fúziót a konstitutív *gpdA* promóterrel is megvalósították, és arra az eredményre jutottak, hogy a fúziós protein folyamatosan a sejtmagban lokalizálódik az indukálószer jelenlététől függetlenül, míg a kontroll nem-fúziós GFP egyenlő arányban oszlik meg a sejtmag és a citoplazma között.

3.7.2. PrnA: A prolin felhasználási útvonal regulátora

A prolin felhasználás útvonalának transzkripció regulátora a PrnA (Pokorska és mtsai., 2000). A fehérje amino-terminális részén lokalizálódó, 2 bázikus aminosavakban gazdag klaszterből és a Zn klaszter első bázikus aminosavainak csoportjából álló NLS-ja az első tripartite-ként (háromosztatú) leírt szignálmolekula. Az előzőekhez hasonlóan, sejten belüli lokalizációjának vizsgálatát natív és *gpd* promóteres *prnA-gfp* (C-terminális) konstrukciók kifejeztetésével is elvégezték. Az 1 kópiás integránsokban már a natív promóterrel meghajtott *gfp* fúziós konstrukció is jól látható volt és teljesen komplementálta a befogadó *prnA* deléciós törzs fenotípusát. A fluoreszcens szignál a prolin indukálószer jelenlétében és hiányában is mindig a sejtmagban volt detektálható (Pokorska és mtsai., 2000), ami összhangban áll azzal, hogy a PrnA szekvenciájában nukleáris export szignál (NES) nem azonosítható.

3.7.3. NirA: A nitrát hasznosítási útvonal regulátora

A nitrát hasznosítási útvonal szabályozása a GATA általános koregulációs faktor, AreA és az útvonal specifikus transzkripció faktor, a NirA szoros együttműködése révén valósul meg (Arst és Cove, 1973; Caddick és mtsai., 1994; Wilson és Arst, 1998; Scazzocchio, 2000). Más Zn-klaszter proteinek NLS szekvenciáival végzett összehasonlító vizsgálat során a fehérje amino-terminális részén kijelölték a lehetséges szignál szekvencia bázikus aminosavait, amelyek a Zn klaszteren (és a DNS kötő doménen) belül, illetve attól up- és downstream irányban helyezkednek el. A NirA intracelluláris lokalizációjának vizsgálata során a kutatók azt figyelték meg, hogy az egykópiás natív promóteres transzformánsok bár komplementálták a *nirA*⁻ mutációt, detektálható fluoreszcens jelet azonban nem mutattak (Berger és mtsai., 2006). A *nirA* magasabb szintű expresszióját a konstitutív *gpd* promóter alkalmazásával tudták elérni. A konstitutívan kifejezett fúziós fehérje szintén komplementálta a *nirA*⁻ fenotípust. A nem-induktív, neutrális körülmények között nevelt gombában a NirA-GFP a citoszolban oszlott el, míg nitrát indukálószer hatására a sejtmagba helyeződött át az indukciót követő 1 percen belül. Az indukált-represszált körülmények között, amikor prolin indukciót követően ammónium represszort csepegtettek az előzőleg indukált mintára, még 90 perces inkubálás alatt sem történt meg a fehérje kilépése a sejtmagból (exportja), annak ellenére, hogy korábbi kísérletek során kimutatták, hogy a represszor jelenlétében a NirA leválik a DNS kötőhelyéről (Narendja és mtsai., 2002). A NirA-GFP csak abban az esetben került vissza a citoplazmába, amikor a repressziót indukálószer mentes környezetben végezték el (Berger és mtsai., 2006), azaz lecserélték az indukciós tápoldatot represszálló, vagy neutrális tápoldatra. Mindez arra utal, hogy a nitrát indukált sejtmagi lokalizáció fenntartásához nem szükséges a NirA DNS-el történő interakciója. A Zn₂Cys₆ klaszter két konzervált ciszteinjének a szerinre történő mutációjával létrehoztak egy DNS kötésre képtelen NirA molekulát, amely elvesztette transzkripció aktiváló szerepét. A DNS kötésre képtelen NirA-GFP fúziós fehérjét hordozó törzsben a lokalizáció vizsgálata ugyanazt az eredményt adta, mint a vad típusú NirA-GFP fúziós törzs esetében kaptak. Az indukált-represszált körülmények között a DNS kötésre képtelen NirA-GFP fúziós fehérje is a sejtmagban maradt. Ezzel a kísérlettel teljesen alátámasztották, hogy a sejtmagi akkumuláció független a DNS-hez történő kötődéstől.

Meg kell említeni, hogy a NirA által szabályozott gének transzkripció aktiválásához az AreA mint pozitív koregulátor hozzájárul (Arst és Cove, 1973; Muro-Pastor és mtsai., 1999; Narendja és mtsai., 2002). AreA funkcióvesztéses mutánsban a nitrát hasznosításban szerepet játszó gének vad típusú NirA háttérben nem tudják a nitrátot hasznosítani.

3.7.4. UaY: A purin felhasználási útvonal regulátora

Az UaY a purin felhasználási útvonal specifikus transzkripció faktor, aminek részletes analízisére *A. nidulans*-ban került sor (Suarez és mtsai., 1995; Cecchetto és mtsai., 2012; Liu és Marzluf, 2004). A natív *uaY* promóterrel (*uaY_p-uaY-gfp*) és konstitutív *gpdA* promóterrel (*gpdA_p-uaY-gfp*) meghajtott *gfp* fúziót kifejező transzformánsokban (C-terminális), a transzkripció faktorok esetén addig még nem tapasztalt sejten belüli mintázatot figyeltek meg (Galanopoulou és mtsai., 2014). Mindkét konstrukció esetén már az egykópiás integrációt hordozó törzsek növekedése kapcsán megfigyelték a purin hasznosításra képtelen törzsben a mutáció fenotípusának komplementációját, de a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során az 1 *uaY_p-uaY-gfp*-vel nem, csak a minimum 3 kópiás *uaY_p-uaY-gfp*-vel sikerült zöld fluoreszcens jelet detektálni (Galanopoulou és mtsai., 2014). Ez a probléma nem volt ismeretlen a kutatók számára, hiszen korábban a NirA transzkripció faktor esetén már megtörtént, hogy fiziológiai promóterével kifejeztetve a fehérjét, nem képződött detektálható mennyiségű fluoreszcens jel (Berger és mtsai., 2006). A kétféle promóterrel kifejeztetett konstrukció indukálószer (húgysav) és represszor (ammónium) hatására is, rendhagyó, ingázó mintázatot mutatott. Nem indukált körülmények között a fluoreszcens jel a citoszolban és a sejtmagban is detektálható volt. Ezt tapasztalták olyan törzsekkel végzett kísérletek során is, ahol a fiziológiás húgysav képződése gátolt. Így arra következtettek, hogy a sejtmagi jelenlét nem az inducer alacsony intracelluláris koncentrációjának következménye, hanem ez a fehérje fiziológiás megjelenése. Az UaY indukálószer jelenlétében teljes mértékben a sejtmagban lokalizálódott, ami nagyon gyorsan, kb. 3-4 perccel az indukció után bekövetkezett. Indukált-represszált körülmények mellett az indukciót követő represszió az UaY-GFP molekulák citoszolba való részleges exportját eredményezte, ami valószínűleg az indukálószer kizárásának, nem pedig az ammónium UaY proteinre vagy az UaY-AreA komplexre gyakorolt hatásának köszönhető (Galanopoulou és mtsai., 2014; Sealy-Lewis és mtsai., 1978). A létrehozott konstitutív mutánsokban génátrendeződések történtek, ami arra utal, hogy az UaY *gpd* promóterrel történő túltermeltetése toxikus a sejtekre (Galanopoulou és mtsai., 2014). A probléma megkerülésére egy indukálható promóterrel építették össze mind a vad típusú *uaY-gfp*, mind pedig a konstitutív *uaY* allél *gfp* fúziós kazettát (*uaY^c462-gfp*). Mind az *uaY-gfp*, mind az *uaY^c462-gfp* fúziót a prolinnal indukálható *prnD* promóterrel fejeztették ki (Gomez és mtsai., 2002). A *prnD_p-uaY^c462-gfp*-t kifejező törzsek a prolin promóter indukciója mellett nem voltak életképesek, ami alátámasztja a túltermelt állapotban tapasztalt toxikus hatást. Egy másik kísérleti rendszerben az *uaY^c462-gfp* mutánsokat 4 óra prolin előindukciót követően urea nitrogénforráson nevelték (Galanopoulou és mtsai., 2014). A

konstitutív mutánsokban a fúziós protein minden vizsgált körülmény esetében (nem indukált, indukált, indukált-represszált és represszált), teljes mértékben a sejtmagban lokalizálódott (Galanopoulou és mtsai., 2014). Mivel kimutatták, hogy az UaY^{c462} konstitutív mutáns hűgysav indukcióra emelt szinten fejeződik ki, megállapították, hogy az UaY konstitutív fehérje sejtmagi lokalizációja szükséges, de nem elégséges a teljes konstitutivitás eléréséhez hasonlóan a NirA-hoz (Bernreiter és mtsai., 2007; Oestreicher és Scazzocchio, 1995).

3.8. Transzkripció faktorok nukleáris transzport mechanizmusai

3.8.1. Nukleáris import mechanizmus

Ahogy láttuk, a génszabályozásban részt vevő transzkripció faktorok egy csoportja folyamatosan a magban, míg másik részük a citoplazmában várakozik az expressziót elindító jelre. Utóbbiaknak mielőbb a sejtmagba kell kerülniük ahhoz, hogy feladatukat elláthassák, azonban az, hogy ezt hogyan hajtják végre, nem minden esetben tisztázott (MacPherson és mtsai., 2006).

Eukarióta sejtekben a nukleáris funkciót betöltő makromolekulák (pl. polimerázok, transzkripció faktorok, riboszóma alegységek) nukleáris transzport mechanizmusokkal jutnak be- és ki a sejtmagból. A sejtmaghártyát áttörő csatornákon azonban, a sejtmag pórus komplexeken (NPC) keresztül csak az ionok és a kisméretű molekulák szabad áramlása biztosított, míg a fehérjék többsége diffúzióval nem kerülhet át. A sejtmaghártya póruskomplexe csak a körülbelül 60 kDa-nál kisebb tömegű citoplazmatikus fehérjék számára átjárható. Magasabbrendű eukariótákban az NPC-t 50-100 különböző fehérje is alkothatja, amelyeket összefoglaló néven nukleoporinoknak neveznek (Gorlich és Kutay, 1999; Reichelt és mtsai., 1990). A pórus komplex szelektivitását az NPC-t alkotó nukleoporinok egy speciális csoportja, a sok, egymás után elhelyezkedő fenilalanin-glicin (FG-) ismétlődést tartalmazó FG-nukleoporinok biztosítják, amelyek kis hidrofób régiókat alkotnak nemcsak a csatorna belső és citoplazma felőli részén, de sejtmag irányú nyúlványain is, térhálós, gélszerű struktúrát hozva létre, amin csak bizonyos méretű molekulák képesek átjutni (Dickmanns és mtsai., 2015). A makromolekulák szállítása az NPC-ken keresztül általában energiafüggő folyamatok révén valósulnak meg, ami számos szolubilis nukleáris transzport molekulát igényel. A szolubilis nukleáris transzport molekulákat 3 csoportba sorolhatjuk: transzport receptorok, adapter molekulák és a RanGTPáz rendszer komponensei (Ribbeck és mtsai., 1998). A citoplazma és a sejtmag között folyamatosan ingázó szállító receptorokat további 2 kategóriába oszthatjuk: vannak nukleáris import receptorok (importinok) és nukleáris export receptorok (exportinok). Eukarióta sejtekben a transzkripció faktorok

transzportja általában olyan oldható, 2 alegységes importinokon, úgynevezett karioferineken keresztül történik, amelyek egy kis (importin α) és egy nagyobb alegységből (importin β) állnak. Specifikus nukleáris lokalizációs jelekhez, 4-8 tagú, főleg lizin, arginin és prolin bázikus aminosavakból álló NLS-okhoz kötődnek, amik átsegítik a transzportálandó fehérjét a nukleáris membránon, szabályozva ezzel sejten belüli lokalizációjukat (Seedorf és mtsai., 1999; Nikolaev és mtsai., 2003). Az NLS-nek nincs meghatározott helye egy fehérje aminosav szekvenciájában, de főként az amino- vagy karboxi terminálison helyezkednek el (Matheny és mtsai., 1994). Három csoportjukat írták le aszerint, hogy egy- (monopartit NLS, pl. Simian Virus 40 T antigénje) kettő- (bipartit NLS, pl. StuA *A. nidulans*-ban) vagy három (tripartit NLS, pl. PrnA szintén *A. nidulans*-ban) bázikus aminosav csoportosulásból állnak-e (Pokorska és mtsai., 2000). Ezek távolsága jelentősen eltérő lehet a különböző bi- vagy tripartit NLS-okban, de körülbelül tíz aminosavnyi távolságban szeparálódnak el egymástól, amelyek szekvenciája irreleváns a transzport szempontjából (Pokorska és mtsai., 2000). A citoplazmában várakozó, sejtmagba szállítandó fehérjék megkötésére a receptor dimerizációja során nyílik alkalom, amikor az adaptorként funkcionáló kis alegység a nagy alegységhez (importin β) kapcsolódik, és olyan konformáció változáson esik át, amelynek hatására szabaddá válik NLS kötő doménje (Enenkel és mtsai., 1995; Gorlich és Kutay, 1999). Az importin β nem csak az adaptor molekulákkal és a transzportálandó fehérjékkel, de a sejtmagpórusokat alkotó FG-nukleoporinok hidrofób oldalláncával is interakcióba léphet. Ezeken "lépegetve" új és újabb, gyenge kölcsönhatásokat létrehozva majd megszüntetve juttatja a fehérjét a magpórus sejtmagi oldalára (Gorlich és mtsai., 1997). A fehérjét az adaptor molekulán keresztül kötő importin β a sejtmagban a kis G fehérjék családjába tartozó, GTP-kötött formában lévő proteinnel, a Ran-nal (Ras-related nuclear protein) találkozik, mellyel RanGTP felismerő doménjén keresztül szintén kölcsönhatásba tud lépni. Ezen interakció következtében az importin β nem képes tovább a szállított fehérjét kötésben tartani, leválik róla. A RanGTP-importin β komplex az FG-nukleoporinokhoz kapcsolódva visszajut a citoplazmába, ahol a Ran-GAP hatására (GTP-áz aktiváló protein) a GTP GDP-vé hidrolizál, és leválik az importin β -ról. Így a citoplazma felőli részre szabad importin β kerül, ami újra képes az NLS-el rendelkező fehérjék megkötésére és szállítására (Gorlich és mtsai., 1997; Gorlich és Kutay, 1999). A Ran-GDP NTF2 (nuclear transport factor 2) nevű fehérjével dimert alkotva, az importinokhoz hasonlóan az FG-nukleoporinokon keresztül szállítódik a sejtmagba, ahol a kromatinhoz kötött Ran-GEF (guanin exchange factor) révén regenerálódik, GDP-jét GTP-re cseréli, amit az NTF2 már nem képes kötni (Ribbeck és mtsai., 1998). Mivel a Ran-GTP szabad állapotban kizárólag a sejtmagban találkozhat az importin β -val, az NLS-

sel rendelkező fehérje csakis a sejtmagban válhat le a receptor molekuláról, az új fehérje felvételét pedig az erősen kötött Ran-GTP megakadályozza.

3.8.2. Nukleáris export mechanizmus

A fehérjék sejtmagból történő kijuttatásához egy újabb jelre (8-15 aminosavból álló NES, főleg leucin és egyéb hidrofób aminosavak) van szükség, amelyek felismerésére az importinokhoz nagyon hasonló felépítésű, exportinok képesek (Gorlich és Kutay, 1999; Henderson és Eleftheriou, 2000). Míg az importinok fehérjékkel való kölcsönhatását a Ran-GTP gátolja, az exportinok esetében pont a fordítottja valósul meg: az exportinok csak akkor tudják megkötni az export szignált, ha a Ran-GTP-vel is kapcsolatot tudnak kialakítani, tehát a sejtmagban (Gorlich és Kutay, 1999; Arts és mtsai., 1998). Ha ez megtörtént, a komplex a sejtmagpóruson keresztül a citoplazmába kerül, ahol a Ran-GAP hatására megtörténik a GTP hidrolízise, a Ran-GDP leválik az exportinról és a fehérje-exportin kölcsönhatás is megszűnik. Mivel a Ran-GAP az NPC citoplazma felőli részén lokalizálódik, a NES-sel rendelkező fehérje csak a citoszolban tud az exportinról leválni.

3.8.3. Importin α független, alternatív transzport útvonal

A 2000-es évek elején egyre több olyan nukleáris import szignált azonosítottak, amelyek szekvenciája nem mutatott szekvenciális hasonlóságot az addig ismert import jelekkel (Nikolaev és mtsai., 2003). Riboszómális proteinekkel, core hisztonokkal, virális proteinekkel, transzkripció faktorokkal (pl. *S. cerevisiae* Gal4p; *A. nidulans* AlcR) végzett kutatások eredményeinek köszönhetően bizonyították az importin α/β heterodimer által vezérelt transzport útvonaltól különböző, alternatív útvonalak létezését is (Jakel és Gorlich, 1998; Johnson-Saliba és mtsai., 2000; Palmeri és Malim, 1999; Chan és mtsai., 1998; Chook és Blobel, 2001; Nakielný és Dreyfuss, 1999; Nikolaev és mtsai., 2003). Ezen útvonalak közös jellemzője, hogy az importin β -val rokon receptorokon keresztül mennek végbe, amelyek közvetlenül, az importin α közreműködése nélkül is képesek a klasszikus szignáloktól eltérő jelmolekulák felismerésére, míg az NPC komponenseihez és a Ran-GTP-hez való kapcsolódás képességében változatlanok (Nikolaev és mtsai., 2003).

4. Célkitűzés

Annak ellenére, hogy számos mikroorganizmus képes a NA egyedüli nitrogénforrásként való hasznosítására, a NA lebontási útvonalat eddig csak prokariótákban vizsgálták, így eukariótákban a NA lebontásának biokémiai lépései és genetikai háttere ismeretlen volt. Az *A. nidulans* modellszervezetről tudták, hogy képes a NA-t egyedüli nitrogénforrásként hasznosítani, tehát rendelkeznie kell NA katabolikus úttal. Ezen kívül a PHII enzim jellemzésével, valamint NA nem hasznosító mutánsok izolálásával már a 70'-es években megerősítették az útvonal létezését és azt, hogy a PHII enzim a $NA \rightarrow 6\text{-NA}$ átalakító képességével a NA lebontás első lépését végezheti, valamint a mutánsok klasszikus genetikai elemzésével kiderítették, hogy létezik egy transzkripciós faktor, ami a NA hasznosításához elengedhetetlenül szükséges, és a működését a NA, vagy annak downstream metabolit származéka indukálja. Kutatócsoportunk a 70'-es évek eredményeit felhasználva célul tűzte ki az eukarióta NA katabolikus útvonal genetikai hátterének és szabályozásának részletes feltárását, amely a későbbiekben segíti a biokémiai folyamatok megismerését. Jelen doktori munka során az alábbi célokat tűztük ki:

1. Előzetes kísérletek (kozmid genom-könyvtár komplementációs eredmények) arra utaltak, hogy a NA lebontási útvonalban szerepet játszó PHII-öt a *hxA*-val homológ *hxnS* gén kódolja, így első célkitűzésünk az volt, hogy *hxnS* deléciós mutáns létrehozásával és vizsgálatával (növekedési tesztek, enzimaktivitás vizsgálat) bizonyítsuk ezt a hipotézist.

2. A PHI és a PHII szekvenciájának és azok elérhető ortológjainak összehasonlításával célul tűztük ki azon konzervatív, csak PHII-ben előforduló aminosavak azonosítását, melyek a PHI-ben lévő megfelelőjétől eltérnek és vélhetőleg a PHII fehérje PHI-től eltérő enzim aktivitásáért felelősek.

3. Mivel ugyanazon genom-könyvtári kozmid transzformációjával Prof. C. Scazzocchio és munkatársai mind a *hxnS41*, mind pedig a *hxnR2* mutánsban komplementációt tapasztaltak, célul tűztük ki a *hxnR* gén azonosítását, és szerepének igazolását annak célzott deléciójával és a mutáns vizsgálatával.

4. Célul tűztük ki annak igazolását, hogy a *hxnR* a NA lebontásban szerepet játszó transzkripciós faktor. Ezért génexpressziós vizsgálatokat (qRT-PCR) terveztünk vad típusú, *hxnRΔ* és *aplAc⁷* (később *hxnRc⁷*, konstitutív *hxnR*) törzseken, nem induktív, induktív és represszált körülmények között, ahol a *hxnS* expresszióját vizsgáltuk. Ezen kívül terveztük, hogy a génexpressziós vizsgálatokat a *hxnR* és *hxnS* géneket határoló szomszédos génekre is kiterjesztjük annak a lehetőségét vizsgálva, hogy létezik-e a prokariótákra jellemző és az

eukarióta primer metabolikus útvonalaknál mutatkozó génklaszterbe rendeződés, amely esetén NA katabolizmusban szerepet játszó egyéb géneket tudnánk azonosítani.

5. A 4. célkitűzés megvalósulása esetén kapott koregulációt mutató gének NA hasznosításban betöltött szerepének igazolását is terveztük, a gének deléciójával és a deléciós törzsek vizsgálatával.

6. Mivel az AreA a nitrogén metabolit útvonalak általános koregulátora (ahogy a bevezetőben említettük a NirA és az UaY esetén is fontos koreguláló szerepet töltött be), célul tűztük ki a *hxnS* és a 4. célkitűzés megvalósítása során azonosított koregulációt mutató gének expressziójának vizsgálatát *areA* funkcióvesztéses és derepresszált mutánsokban qRT-PCR analízissel.

7. További célul tűztük ki a NA inducer szerepének tanulmányozását *hxB20* mutáns törzsben vizsgált *hxnS* génkifejeződés vizsgálatával.

8. Ezeken kívül a *hxnR* transzkripció faktor szerkezet-funkció vizsgálatát is célul tűztük ki, amit a HxnR-GFP fúziós protein intracelluláris lokalizációjának vizsgálatával kívántuk teljessé tenni, nem induktív, induktív és represszált körülmények bevonásával.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Alkalmazott mikroorganizmusok

A kísérletek során alkalmazott *Aspergillus* és *E. coli* törzsek az 1. mellékletben lettek listázva.

5.2. A tenyésztés során alkalmazott táptalajok és táptalaj komponensek

Komplett táptalaj (CM) (Cove, 1966):

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

Szacharózos minimál táptalaj (SM) (Antal és mtsai., 1997):

2 v/v% sóoldat; 0,1 g/l glükóz; 342,3 g/l szacharóz; 10 g/l agar (Bacto™) (top agar) vagy 25 g/l agar (Bacto™) (normál tenyésztés); nitrogénforrással, illetve a szükséges vitaminnal kiegészítve; pH 6,8

Minimál tápoldat (MM) (Cove, 1966):

2 v/v% sóoldat; 0,1 g/l glükóz; nitrogénforrással, illetve a szükséges vitaminnal kiegészítve; (pH 6,8)

Luria-Bertani (LB) tápoldat (Sezonov és mtsai., 2007):

10 g/l tripton; 10 g/l NaCl; 5 g/l élesztőkivonat

Amennyiben táptalajra volt szükségünk, a tápoldatokhoz 25 g/l agart is mértünk. Transzformáns *E. coli* telepek szelektálásához és felszaporításához a táptalajt vagy tápoldatot 50 µg/ml mennyiségű ampicillinnel egészítettük ki.

Sóoldat (Cove, 1966):

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

Nyomelem-törzsoldat (Cove, 1966):

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

Alkalmazott nitrogénforrások:

10 mM nátrium-nitrát; 10 mM NA (1 M NaOH-ban oldott 1 M törzsoldatból); 10 mM 6-NA (1 M NaOH-ban oldott 1 M törzsoldatból); 10 mM 2,5-DP (por formában a tápközeghez adagolva); 1 mM hipoxantin (por formában a tápközeghez adagolva); 5 mM ammónium-L (+)-tartarát; 5 mM urea; 1 mM acetamid; 5 mM prolin; 10 mM NAA (por formában a tápközeghez adagolva)

Alkalmazott indukálószer:

1 mM vagy 100 μ M NA (1 M NaOH-ban oldott 1 M törzsoldatból); 1 mM vagy 100 μ M 6-NA (1 M NaOH-ban oldott 1 M törzsoldatból); 5 mM prolin; 0,6 mM húgysav; 100 μ M 2,5-DP (por formában a tápközeghez adagolva), 100 μ M NAA (por formában a tápközeghez adagolva)

Alkalmazott gátlószer:

5 mM ammónium-L (+)-tartarát; 5,5 μ M allopurinol (a *hxA* által kódolt purin hidroxiláz I enzim aktivitásának gátlása); 12,5 mM cézium- klorid (reziduális növekedés csökkentése mutagenézis kísérletekben)

Vitaminok:

40 μ g/l pantoténsav; 40 μ g/l para-amino-benzoésav; 50 μ g/l riboflavin; 25 μ g/l piridoxin; 0,1 μ g/l biotin; 50 μ g/l tiamin

Szerves bázisok:

1g/l uracil; 1 g/l uridin

5.3. Az *A. nidulans* tenyésztése során alkalmazott körülmények

Táptalajon történő nevelés során a leoltást steril fogpiszkáló segítségével végeztük. A felhasznált törzsek 0,01 v/v% Tween 80 oldatban készített konídium szuszpenzióival nedvesített fogpiszkálót a táptalajba szúrtuk (pontba oltottunk) és a csészéket sötétben, 37 °C-on inkubáltuk. A folyadékkultúrák elkészítéséhez CM táptalajra 5 pontba szúrt, 37 °C-on, 4 napig nevelt tenyészeteket használtunk. A spórákat 10 ml, 0,01 v/v% Tween 80 oldatba gyűjtöttük, majd a kísérleti céloknak megfelelően 100 illetve 300 ml, vitaminnal kiegészített minimál tápoldatba oltottuk.

Totál DNS kivonáshoz CM táptalajon nevelt tenyészet telepéről, 10 ml 0,01 v/v%-os Tween 80 oldatba 10^9 db spórát gyűjtöttünk és a szuszpenziót 100 ml, a törzs vitamin auxotrófiájának megfelelően kiegészített, minimál tápoldatba öntöttük és 37 °C-on egy éjszakán át ráztuk.

A fehérje extrakcióhoz CM táptalajon nevelt tenyészetéről 5×10^9 db spórát gyűjtöttünk, amiket 20 órán keresztül 37 °C-on inkubáltunk 180 rpm rázás mellett 300 ml glükóz szénforrást valamint acetamid, urea vagy prolin nitrogénforrást tartalmazó tápoldatban. 15 órás növekedés után szükség szerint indukáltunk 1 mM NA-val, 1mM 6-NA-val vagy 0,6 mM húgysavval.

A mRNS kivonáshoz CM táptalajon nevelt $2,5 \times 10^9$ db spórát acetamid vagy urea nitrogénforráson, 300 ml tápoldatban, 10 órán keresztül, 37 °C-on és 150 rpm-en történő rázás mellett növesztettünk. Indukálás vagy represszáls esetén 8 órás növekedés után 1 mM NA-val, 1 mM 6-NA-val, 0,6 mM húgysavval (indukálás), vagy 5 mM ammónium-L (+)-tartaráttal (represszáls) egészítettük ki a tápoldatot.

5.4. 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

5.5. 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

5.6. Fehérje izoláláshoz használt oldat

50 mM Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 1,5 mM fenilmetilszulfonil-fluorid (PMSF)

5.7. Agaróz gélelektroforézishez használt oldat

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

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

5.8. Kompetens *E. coli* készítéséhez használt oldatok

SOB tápoldat: 2% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM kálium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 10 mM magnézium-szulfát, pH 6,7-7,0 (5 M kálium-hidroxid oldattal beállítva)

TB puffer: 10 mM PIPES, 15 mM kalcium-klorid, 250 mM KCl, 55 mM mangán-klorid, pH 6,7

5.9. Polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakciók reakcióelegyét az alkalmazott Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS polimerázhoz (Thermo Scientific) mellékelt gyártói utasítások szerint állítottuk össze, 50 µl végtérfogatban. Egy PCR reakcióelegy az alábbi komponenseket tartalmazta:

- 1X Phusion HF puffer (*hxnR* amplifikáció esetén GC puffer)
- 0,2-0,2 mM dNTP
- 0,5 µM forward és reverz primerek
- 50-250 ng DNS templát
- 0,02 U/µL Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS Polimeráz

A polimerizáció az alábbi körülmények között zajlott:

- 98 °C, 30 s elődenaturáció
- 98 °C, 10 s denaturáció
- 58-72 °C 30 s hibridizáció
- 72 °C mérettől függően 30 s-3 perc polimerizáció (30 s /1 kb)
- 72 °C, 1-6 perc utópolimerizáció

A Southern hibridizációhoz készített DNS próbák jelölését az Expand Long Template PCR System és a DIG-dUTP jelölő hibridizáló kit (Roche) segítségével végeztük el. A reakcióelegyeket 30 µl végtérfogatban az alábbiak szerint állítottuk össze:

- 1X 1. puffer
- 0,3-0,3 mM Dig-dNTP
- 0,3 µM forward és reverse primerek
- 0,075 U/µl Long Expand Polimeráz
- 50-250 ng vad típusú totál DNS kivonat

A reakció az alábbi körülmények között játszódott le:

- elődenaturáció: 94 °C; 30 s;
- denaturáció: 94 °C; 10 s;
- hibridizáció: 58 °C, 45 s;
- polimerizáció: 68 °C, 1-2 perc (40 s/1 kb);
- utópolimerizáció: 68 °C, 2-4 perc.

A 2., 3. és 4. lépés mindkét polimeráz esetében 34 cikluson keresztül ismétlődött. A lehetséges indítószekvencia-kombinációk nagy száma és a reakciók során képződő amplikonok különböző méretei miatt a hibridizációs hőmérsékleteket, a polimerizáció és utópolimerizáció időtartamát minden egyes reakcióra külön optimalizáltuk.

5.10. DNS gélelektroforézis

A PCR során létrejött termékek méretét és mennyiségét gélelektroforézissel ellenőriztük. A reakcióelegy 1-1 µl-ét 8 g/l agaróz gélen, TAE pufferben futtattuk meg, Bio-Rad horizontális gélelektroforézis készülékkel. Az elektroforézist 100 V állandó feszültségen végeztük. Annak érdekében, hogy a DNS-t láthatóvá tegyük, a gél 5 µg/ml EtBr-dal kiegészítve készítettük el. A géleket ultraibolya fénnel világítottuk meg, és UVP (BioDoc-It™) készülékkel dokumentáltuk.

5.11. PCR termékek tisztítása

Az amplikonokat több esetben is további enzim reakcióhoz használtuk fel, így a reakcióelegyeket az indítószekvenciáktól, sóktól és a polimerizációhoz alkalmazott enzimtől a Gel/PCR Fragments Extraction KIT (Geneaid)-tel tisztítottuk, a gyártó instrukcióit követve. A folyamat végén visszanyert termékek koncentrációját DNS gélelektroforézissel ellenőriztük.

5.12. Tisztított PCR termékek preparatív izolálása és vektorba ligálása

A tisztított PCR-termékeket újabb PCR-hez vagy emésztéshez használtuk fel. Klónozáshoz a DNS-t restrikciós endonukleázzal (Thermo Scientific) emésztettük a gyártó utasításai alapján, majd a megfelelő méretű DNS-fragmentumot a Gel/PCR Fragments Extraction KIT (Geneaid) segítségével a gyártó utasításai alapján gélből visszaizoláltuk. A tisztított termékeket a hasonló módon nyert, gélből visszaizolált, emésztett pBluescript II SK, pJET, pAN-HZS-1, pAN-HZS-5 vagy pAN-HZS-7 vektorokkal ligáltuk T4 ligáz (Fermentas) felhasználásával a gyártó utasításai alapján.

5.13. Kompetens *E. coli* sejtek készítése

A vektorkonstrukciók felszaporításához JM109 *E. coli* (pBluescript II SK és pAN-HZS vektorkonstrukciók felszaporításához) illetve XL-1 Blue (pJET vektorkonstrukciók felszaporításához) kompetens sejteket készítettünk. LB táptalajon egyedi telepeket izoláltunk, majd egy kolóniát 25 ml LB tápoldatba oltottunk, amit 37 °C-on 8 órán keresztül rázattunk (180 rpm). Az induló tenyészet 15 ml-ét 250 ml SOB tápoldatba oltottuk, amit 16 °C-on tovább kevertettünk. Amint a tenyészet optikai denzitás (OD) értéke 600 nm-en elérte a 0,4 értéket, a sejteket 5000 rpm, 10 perc centrifugálással összegyűjtöttük (4 °C), és 80 ml TB pufferrel történő mosás után 20 ml TB pufferben felfuszpendáltuk, amit 8% dimetil-szulfoxiddal (DMSO, Sigma) egészítettünk ki. A szuszpenzióból 40-40 µl-eket 1,5 ml mikrocentrifuga csövekbe adagoltunk, és folyékony nitrogénben fagyasztottunk. A transzformálásra kész sejteket felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

5.14. *E. coli* sejtek transzformálása

Az *E. coli* szuperkompetens sejteket jégen pár perc alatt kiolvastottuk, majd 7,5 µl ligálás-reakció hozzáadása után jégen inkubáltuk 25 percig. Ezután 2 perc 42 °C-os hőshock kezelést alkalmaztunk, majd a mintákra 800 µl LB oldatot mértünk. A sejteket 45 percig 37 °C-on regeneráltuk, és 50 µg/ml ampicillint tartalmazó LB-táptalajra szélesztettük. A transzformánsokat egy napig inkubáltuk 37 °C-on (Yanisch-Perron és mtsai., 1985).

5.15. Plazmid DNS izolálás: "Mini Preparátumok" készítése

Az ampicillines LB táptalajon életképesnek bizonyult egyedi kolóniát képező transzformáns JM109 vagy XL1-Blue sejteket, steril fogpiszkáló segítségével 2 ml LB tápoldatba oltottuk, és 37 °C-os inkubátorban egy éjszakán át növesztettük. A szelekciós nyomást 50 µg/ml ampicillin kiegészítéssel tartottuk fenn. Az izolálást a továbbiakban "Mini" plazmid tisztító kit (Mini *Plus* Plasmid DNA Extraction System, Viogene) segítségével végeztük, a gyártó instrukcióinak megfelelően. A tisztított plazmid DNS-t restrikciós endonukleázokkal emésztettük 1,5 órán át, majd 8 g/l agaróz gélen történő elválasztás alapján kiválogattuk a megfelelő transzformánsokat.

5.16. Plazmid DNS izolálás: "Maxi Preparátumok" készítése

A "Mini" preparálás során kiválogatott transzformáns *E. coli* sejteket 100 ml, 50 µg/ml ampicillinnel kiegészített tápoldatban tenyésztettük 37 °C-on egy éjszakán át. A plazmid DNS

kivonást "Maxi" plazmid tisztító kittel (Midi *Plus* Ultrapure Plasmid Extraction System, Viogene) végeztük, a gyártó által mellékelt protokollt követve.

5.17. *A. nidulans* transzformálás

Az *A. nidulans* transzformálást Antal és mtsai. (Antal és mtsai., 1997) nyomán hajtottuk végre, celofántenyészetten előállított protoplasztok (Ferenczy és mtsai., 1975; Kevei és Peberdy, 1977) felhasználásával a következőképpen: celofánnal fedett komplett táptalaj felszínén tenyészeteket neveltünk (37 °C, 14-16 óra), majd a celofánokat hármassával, fejjel lefelé, steril Petri-csészékbe gyűjtöttük, és protoplasztáló folyadékban legalább 45 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A protoplasztképzést 0,7 M KCl-ban oldott, 10 mg/ml koncentrációjú Glucanex enzimkeverékkel végeztük (Novozym). A képződött protoplasztokat 0,7 M KCl-al lemostuk a celofánról, majd 75-100 µm rácsszerkezetű nylon filteren történő szűréssel megszabadultunk a micéliális szennyeződésektől. A sejtfal nélküli sejteket 4000 g, 25 percig tartó (16 °C) centrifugálással üveg centrifugacső aljára ülepítettük, majd a pelletet kézi rázással fellazítottuk és 10 ml 0,7 M KCl oldattal átmostuk. Újabb centrifugálás után (4000 g, 5 perc, 16 °C), a sejteket 1 ml 0,7 M KCl-ban szuszpendáltuk fel, és Bürker-kamrában számolva megállapítottuk a protoplaszt koncentrációt. 5×10^7 illetve 5×10^6 db protoplasztot 200 µl TN1 oldatban felsuszpendáltunk, majd az elegyhez 5-10 µg DNS-t valamint 55 µl TN2 oldatot mértünk és 30 percen keresztül jégen inkubáltuk. Ezt követően 1 ml TN2-t adagoltunk a csövekbe, pipettával homogenizáltuk és 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a PEG tartalmat 10 ml 0,7 M KCl-os mosással távolítottuk el. A protoplasztokat 4000 g 20 percig tartó centrifugálással ülepítettük. A sejteket 1 ml 0,7 M KCl oldatban fellazítottuk, pipettával homogenizáltuk, majd 40 °C-os 50 ml szacharózos top agar MM-ba kevertük, végül pedig 10 db SM táptalaj tetején eloszlattuk. A szelekciós marker gént (*pantoB*⁺, *pyroA*⁺, *riboB*⁺) hordozó vektor konstrukciók sikeres genomba épülése és kifejeződése esetén, azok komplementálják a transzformált törzs auxotrófiáit (pantoténsav, para-amino-benzoésav, riboflavin), így a protoplasztok 3-4 nap regenerációt követően minimál táptalajon telepet tudnak képezni.

5.18. Totál DNS kivonása *A. nidulans*-ból

A törzseket az 5.3. pontban részletezett módon folyadékkultúrában felneveltük, majd a micéliumokat nylon filterrel összegyűjtöttük, desztillált vízzel mostuk és papírtörölő felhasználásával szárazra csavartuk. A biomasszát folyékony nitrogénben történő fagyasztás

után kerámia mozsárban folyékony nitrogénben liszt finomságúra őröltük. A totál DNS kivonáshoz kb. 0,1 g porított micéliumhoz 800 µl LETS puffer-t adagoltunk, és erős vortexelést követően 800 µl PCI-vel extraháltuk. Ezt követően 13 000 rpm-en, 10 percig centrifugáltunk, majd a DNS-t tartalmazó vizes fázist egy kloroformos extrakciót követően (kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú keverék) 1x mennyiségű izopropanollal kicsaptuk. A DNS kicsapás hatékonyságát 1/10 térfogat 3 M-os nátrium-acetát hozzáadásával növeltük a kicsapás előtt. Az elegyet minimum fél órán át -20 °C-on tartottuk, majd a DNS-t 13 000 rpm 10 percig történő centrifugálással összegyűjtöttük és a pelletet 70% etanollal mostuk. A pelletet száradás után 0,05 mg/ml RNáz oldatba oldottuk fel. A minták DNS tartalmát 8 g/l agaróz gélen való szeparálással (1-1 µl) DNS molekulásúly jelenlétében ellenőriztük.

5.19. Southern-hibridizáció

Az elkészített totál DNS kivonatokból 10 µg DNS mennyiségeket restriktációs endonukleázzal egy éjszakán át emésztettünk. Másnap a DNS-t izopropanolos kicsapást követően 70% etanollal mostuk, majd 20 µl desztillált vízben oldottuk fel és DIG-jelölt DNS Molekulásúly Marker VII (Roche) mellett, EtBr mentes, 8 g/l agaróz gélen megfuttattuk. A DNS-t 20x nátrium-citrát és nátrium-klorid oldatában (SSC-ben) Amersham Hybond-N (GE Healthcare) filterre blottoltuk és UV expozícióval kovalensen rögzítettük. A jelölt próbák előállítása az 5.9. pontban részletezett módon történt. A blottolást a továbbiakban Sambrook (Sambrook, 1989) szerint végeztük el. A jelölt próbával hibridizált DNS szakaszokat Antidigoxigenin-AP Fab fragmentumokkal (Roche) és NBT/BCIP (Roche) oldattal tettük láthatóvá.

5.20. *A. nidulans* törzsek heterozigóta keresztezése

A keresztezéshez olyan törzseket választottunk, amelyek mindegyike hordoz legalább egy olyan mutációt, amely olyan auxotrófiát okoz, ami a partner törzsben nem található meg, és így a heterokarionban egymás auxotrófiáját tudják majd komplementálni. A keresztezés első lépéseként a szülői törzseket komplett táptalajon növesztettük úgy, hogy növekedés közben a telepek szélei összeérjenek (sakktábla-szerű oltás). Az összeérő teleprészletet steril lándzsátűvel kivágtuk, és 4 db agarkockát fejjel lefelé minimál táptalajra borítottunk. Ezen a táptalajon egyik szülői törzs sem tud nőni önmagában, csak a gombafonalaik fúziójával (hifaanasztomózissal) létrejövő heterokarionok életképesek. 3 nap 37 °C-on történő inkubálást követően a csészék peremét cellux szalaggal lezártuk, amivel oxigénmentes környezetet

hoztunk létre, ami szexuális reprodukciós folyamatokat indukált. Ennek köszönhetően 2 hét (37 °C) inkubálást követően érett, fekete, rekombináns vagy szülői genotípusú kleisztotéciumokat tudtunk gyűjteni. 8-at minimál táptalajon steril fogpiszkálóval görgetve megtisztítottunk az ivartalan konídiospóráktól, Hülle-sejtektől és micéliumoktól, és a megtisztított termőtesteket egyesével 200-200 µl, 0,01 v/v% Tween 80 oldatba helyeztük. A mikrocentrifuga cső falához nyomva összetörtük őket, hogy az aszkospórák kiszabaduljanak. Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy szülői vagy pedig rekombináns kleisztotéciumokat gyűjtöttünk, a szuszpenziókból 5-5 µl mennyiségeket felhasználva, steril pipetta hegygel minimál táptalaj felületére szélesztettük az aszkospórákat. A táptalaj vitaminoldatokat nem tartalmazott, így csak abban az esetben történhetett telepképzés, ha a vad típusú és mutáns markergének, amelyek az auxotrófiáért felelősek rekombinálódtak, és az utódok között prototróf tulajdonságokkal rendelkező egyedek is létrejöttek. A rekombináns kleisztotéciumok szuszpenzióinak 200-szoros hígításaiból 30, 40, illetve 50 µl mennyiségeket steril üvegbottal CM táptalajra szélesztettünk. 2 nap, 37 °C inkubációt követően az egyedi telepekből spóraszuszpenziót készítettünk, és utódanalízis céljából különböző összetételű táptalajra oltottuk őket.

5.21. RNS kivonás *A. nidulans*-ból, cDNS szintézis

A totál DNS kivonásnál ismertetett technikát ismételve (5.18. pont) az összegyűjtött micéliumot folyékony nitrogénben por finomságúra őröltük. Totál RNS-t a NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel) segítségével vontunk ki, a gyártó előírásainak megfelelően 100 mg porított biomasszából. Az izolátumok RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000-es spektrofotométer készülék segítségével határoztuk meg. A cDNS szálak szintézise a RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Scientific) felhasználásával, a gyártó mellékelt utasításai szerint történt. A reverz transzkripcióhoz 1 µg RNS templátot, és 0,5-0,5 µl oligo dT(18) és random hexamer primer keverékét használtuk fel.

5.22. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A cDNS-mintákkal végzett génexpressziós vizsgálatokat a Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) Kit (Thermo Scientific) felhasználásával a gyártó utasításainak megfelelően végeztük, 20 µl végtérfogatban (CFX96 Real Time PCR System (Biorad) készülékkel). Az alábbi reakciókörülményeket állítottuk be:

- 95 °C, 3 perc

- 45 cikluson keresztül 95 °C 10 s, 60 °C, 30 s

Az adatok a "standard curve" eljárással értékeltük ki (Larionov és mtsai., 2005). Minden mérés 3 párhuzamos mintával zajlott és minimum két biológiai párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

5.23. Kópiaszám meghatározás qPCR alkalmazásával

A transzformálások során integrálódott gének kópiaszámát az alábbi képlet szerint határoztuk meg: $C_{\text{actin}} - C_{\text{X gén}} = Y$; majd 2^Y , ahol „ C_{actin} ” a γ -aktin háztartási gén Ct értéke, „ $C_{\text{X gén}}$ ” a vizsgált gén Ct értéke, Y pedig a két érték különbsége. A reakció elegyet a Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) Kit (Thermo Scientific) felhasználásával a gyártó utasításainak megfelelően mértük össze, amibe 5 pg totál DNS kivonatot mértünk, 20 μ l végtérfogatban. A reakciókörülmények az előbbi pontban leírtakkal megegyeztek.

5.24. Mutagenézis kísérletek kivitelezése

UV mutagenézis kísérleteinkhez a HZS.98 (*pantoB100 pabaA1 veA1*), HZS.248 (*hxAA::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1*) és HZS.418 (*hxA18 pantoB100 veA1*) *A. nidulans* törzseket választottuk. 4 nap komplett táptalajon növesztés után a törzsekből 0,1 v/v% Tween oldatba steril ecsettel 10^9 db konídiumot gyűjtöttünk 20 ml végtérfogatban. A szuszpenziókat legalább 5 perces intenzív vortexelést követően 14,5 cm átmérőjű Petri csészébe öntöttük, és lassú (50 rpm), folyamatos rázatás mellett, 20 perces UV kezelésnek (UV lámpa: Philips TUV15W 9L1, 254 nm) tettük ki. 4-nitroquinolin 1-oxid-dal (4-NQO) a HZS.248 törzs felhasználásával Prof. C. Scazzocchio végzett el számunkra mutagenézist (Bal és mtsai., 1977). A konstitutív mutánsokat hipoxantin nitrogénforrást tartalmazó táptalajon szelektáltuk, amit 5,5 μ M allopurinollal (HxA gátlás) és 12,5 mM cézium- kloriddal (reziduális növekedés csökkentése) egészítettünk ki.

5.25. Mutációk azonosítása szekvenálással; a *hxnP* és *hxnS* intron szekvenciáinak meghatározása

A *hxnS* és *hxnR* mutáns törzsekben a nukleotid változásokat totál DNS templárról (5.18. pont) felszaporított PCR termékek ("hxnS cDNS EcoR frw2"- "hxnS cDNS EcoRI rev": 4200 bp; "hxnR XbaI frw"- "hxnR KpnI rev": 2929 bp) szekvenálásával azonosítottuk. A *hxnS* tisztított PCR terméket EcoRI-gyel, a *hxnR*-t XbaI/KpnI-gyel emésztettük, majd EcoRI, illetve XbaI/KpnI emésztett pBluescript II SK vektorba ligáltuk. A szekvenálást a *hxnS* gén

esetében a "hxnS F0", "hxnS F420", "hxnS F820", "hxnS F1227", "hxnS F1627", "hxnS 2030", "hxnS F2430", "hxnS F2830", "hxnS F3230", "hxnS F3636", "hxnS F4055" és "hxnS R275" primerek, a *hxnR* gén esetében pedig a "hxnR 2F", "hxnR 800F", "hxnR 1375F", "hxnR 1958 F" primerek alkalmazásával végezték.

A *hxnP* 4. intron szekvenciájának meghatározásához a *hxnP*⁺ törzs (FGSC A26) cDNS templátjáról PCR reakcióval amplifikáltuk a *hxnP* gént ("hxnP int frw"- "hxnP int rev"), majd az 1163 bp hosszú terméket Gel/PCR Fragments Extraction KIT (Geneaid) segítségével megtisztítottuk és a tisztított ampikonon szekvencia meghatározást végeztettünk. Az RNS minta elkészítéséhez a tenyészetet 1 mM acetamid N-forráson 8 órán keresztül 37 °C-on rázattuk, majd 1 mM 6-NA-val indukáltuk további 2 órán át.

A *hxnS* RNS minta elkészítéséhez *aplA*^{c7} (FGSCA872) *A. nidulans* törzset 10 órán keresztül acetamid nitrogénforrást tartalmazó tápoldatban rázattuk, 37 °C-on. Az RNS kivonást követően írt cDNS templátról a gént a "hxnS cDNS EcoI frw3" és "hxnS cDNS EcoRI rev" primerekkel szaporítottuk fel, majd a tisztított 4191 bp hosszú PCR terméket EcoRI-el hasítottuk és pBluescript II SK vektorba klónoztuk. A szekvenálást a *hxnS* mutációk azonosításához használt primerekkel végeztük.

A DNS nukleotid sorrendjét Sanger szekvenálással minden esetben a németországi LGC cég határozta meg (<http://www.lgcgroup.com>). A szekvenálásokhoz használt primerek szekvenciái a 4. mellékletben találhatóak. A cég által meghatározott contig-okat DNA BASER programmal fűztük össze, a szekvencia illesztéseket pedig a Multiple Sequence Alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Edgar 2004) segítségével végeztük.

Az aminosav változásokat az EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq) alkalmazásával azonosítottuk.

5.26. Enzim aktivitás vizsgálat

Az 5.3. pont alapján tenyésztett, és 5.18. pontban részletezett módon előállított porított micélium (0,5 mg) fehérjetartalmát 1,5 mM PMSF-et tartalmazó 1 ml minta pufferrel (fehérje extraháló puffer) extraháltuk ki. Intenzív vortexelés, majd többszöri 13.000 rpm, 5 perc centrifugálás (4 °C) után a folyadék fázist új centrifuga csőbe pipettáztuk (Karacsony és mtsai., 2014). A minták fehérjetartalmát Bradford módszer alkalmazásával határoztuk meg (Bradford, 1976). 50 µg mennyiségű fehérjéket 0,025 M Tris- 0,19 M glicin katód pufferben (pH8,3), 10% poliakrilamid gélen választottunk el (Laemmli, 1970). A HxnS és HxA fehérjék aktivitását szubsztrát-tetrazólium festéssel detektáltuk (Scazzocchio és mtsai., 1973) (6. ábra).

Az elektroforézist követően a géleket 12-16 órán keresztül folyamatos, lassú rázatás mellett 100 mM nátrium-pirofoszfát oldatban mostuk 4 °C-on, majd 1,27 mg/ml jodo-nitro-tetrazólium-kloridot (Sigma) és szubsztrátként 0,5 mg/ml hipoxantint (Scazzocchio és mtsai., 1973), 0,5 mg/ml NADH-t vagy 0,5 mg/ml NA-t (100 mM pirofoszfátban (Sigma) (pH9,4) oldva) tartalmazó reakcióelegybe áztattuk a sávok megjelenéséig (Lewis és Scazzocchio, 1977).

6. ábra: A tetrazólium/szubsztrát festés kémiai alapja

A purin hidroxiláz I és a purin hidroxiláz II enzimek a hipoxantinról, NA-ról és a NADH-ról egy elektront adnak át a tetrazólium sónak, amelyből vízben oldhatatlan, lilás színű formazán képződik.

5.27. A klasztereződést mutató *hxn* gének deléciója

5.27.1. A *hxnS* gén deléciója a Chaverocce-féle eljárás szerint

A *hxnS* gén delécióját a Chaverocce és mtsai. által kifejlesztett módszer alapján (Chaverocce és mtsai., 2000) csoportunk hajtotta végre és a létrehozott törzset (HZS.106 és annak keresztezéséből származó utódait) számos növekedési- és néhány enzimaktivitás tesztben felhasználtuk. A vizsgálatok során észleltük, hogy bizonyos vizsgálati rendszerekben a törzs hasonlít a konstitutív *hxnR* mutánshoz. qPCR segítségével kimutattuk ("hxnR ReTi frw". "hxnR ReTi rev"), hogy a deléciós törzsben a *hxnR* transzkripció faktor gén 15 kópiában van jelen, amely jelenséget a Chaverocce-féle genommodosítási eljárás alkalmazásakor gyakran bekövetkező ektopikus integrációk idéztek elő. A Chaverocce-féle módszer során a targetálni kívánt gént hordozó kozmidon *E. coli* törzsben hozzuk létre a deléciót, majd a deléciós génmodosítást hordozó kozmiddal transzformáljuk a gombát és elérjük, hogy homológ rekombinációval a módosított genomi régió kicserélődjön a recipiens törzsben található homológ régióval. A kozmid nagysága miatt nem lehetett a Southern hibridizációs eljárással ektopikus integrációt ellenőrizni, qPCR-rel történő kópiaszám ellenőrzés pedig nem történt a szelekciós marker génre, vagy a szomszédos génekre nézve a deléció előállításának idején. Az ektopikus integrációk magas száma miatt a keresztezés sem volt lehetséges. Ezért szükségessé vált a *hxnS* deléció újbóli végrehajtása, amit a HZS.120 törzsben a Double-Joint PCR módszerrel (Yu, és mtsai., 2004) összeszerelt génszubsztitúciós

kazetta alkalmazásával a csoportunk hozott létre. A növekedési tesztek már az új *hxnSΔ* törzzsel készültek (HVS.548).

5.27.2. A *hxnR* gén deléciója Chaverocce-féle eljárás szerint

A *hxnR* delécióját a *hxnS* deléciójához hasonló módon a Chaverocce-féle módszer alapján (Chaverocce és mtsai., 2000) hozták létre külföldi munkatársaink a Prof. Scazzocchio vezette csoportban. Amikor a *hxnRΔ* törzsben génmódosítási munkákat hajtottunk végre jelen disszertáció tárgyaként (*hxnR-gfp* fúzió kifejeztetése), akkor merült fel annak a gyanúja, hogy az ugyanezen deléciós módszerrel létrehozott *hxnS* deléciós törzshöz hasonlóan a *hxnRΔ* törzsbe is több kópiába beépülhetett a *hxnR::zeo* génszubsztitúciót hordozó kozmid, ami az Eredmények fejezetben (6.7.1. pont) kifejtett módon hátráltatta kísérleteink sikeres kivitelezését. Szükségsszerűvé vált az *hxnR* gén Double-Joint PCR módszerrel (Yu és mtsai., 2004) történő deléciója (lásd 5.27.3.5. alfejezet).

5.27.3. A *hxnT/Y/Z/P* és *hxnR* gének deléciója Double-Joint PCR módszerrel

A *hxnT/Y/Z/P/R* klaszter gének deléciójához 3 komponensű szubsztitúciós kazettát építettük össze Double-Joint PCR módszerrel (Yu és mtsai., 2004) (7. ábra). A PCR reakciók során a következő komponenseket szaporítottuk fel:

- "A" komponens: a deletálni kívánt géntől upstream elhelyezkedő szekvencia, amely a homológ rekombinációt szolgálja.
- "B" komponens: a transzformáció során a szelekciót biztosító marker gén, amely komplementálja a recipiens törzs auxotrófiáját. Amplifikációja során olyan speciális kiméra primereket használtunk fel, amelyek 5' vége specifikus az upstream régió 3' végével (forward chimera primer esetén), illetve a downstream régió 5' végével (reverse chimera primer esetén). A kiméra részek a szomszédos kazetta-elemekkel történő összeszerelést biztosítják azáltal, hogy az összeszereléskor primer-ként funkcionálnak.
- "C" komponens: a deletálni kívánt géntől downstream elhelyezkedő szekvencia, amely a homológ rekombinációt szolgálja.

Az 1. PCR során felszaporított szekvenciákat a Gel/PCR Fragments Extraction KIT (Geneaid) felhasználásával tisztítottuk meg a korábbi reakció primereitől (5.11. pont), majd ezeket az átfedő PCR termékeket templákként használva egy újabb PCR reakcióban 1 molekulává szereltük össze és nested A és C specifikus primerekkel amplifikáltuk. A deléció

kazették "A", "B" és "C" komponenseinek felszaporításához, valamint azok fúziójához alkalmazott primerek szekvenciáit a 2. mellékletben tüntettük fel.

7. ábra: A szubsztitúciós kazetták elkészítésének sematikus ábrázolása

Piros téglalap (HR1): a deletálni kívánt géntől upstream elhelyezkedő szekvencia, a szubsztitúciós kazetta "A" komponense; amplifikációja "upstream frw" és "upstream rev" primerpárokkal történt (piros nyilak). Zöld téglalap: a deletálni kívánt gén szekvenciája. Kék téglalap (HR2): a deletálni kívánt géntől downstream irányba eső szekvencia, a szubsztitúciós kazetta "C" komponense, amit a "downstream frw"-"downstream rev" primerpárok használatával készítettünk el (kék nyilak). Citromsárga téglalap: szelekciót biztosító marker gén szekvenciája, a szubsztitúciós kazetta "B" komponense; elkészítése olyan specifikus primer szekvenciákkal történt, amelyek egyik része a deletálni kívánt gén upstream (piros-sárga nyíl piros része) vagy downstream (kék-sárga nyíl kék része) szekvenciájával, másik része pedig a szelekciós markergén szekvenciájával homológ (nyíl sárga része). A 3 komponens összeépítése a "nested upstream frw" (narancssárga nyíl) és "nested upstream rev" (sötétkék nyíl) indítószekvenciákkal történt.

5.27.3.1. *hxnZ* deléció

A *riboB*⁺ szubsztitúciós kazetta 2532 bp, 2266 bp és 2530 bp hosszú "A", "B" és "C" komponensét a "hxnZ upst frw"-"hxnZ upst rev", a "hxnZ ribo chim frw"-"hxnZ ribo chim rev" és a "hxnZ down frw"-"hxnZ down rev" primerekkel sokszoroztuk fel, amely termékek "hxnZ upst nest frw"-"hxnZ upst nest rev" primerekkel történő összeépítése és sokszorosítása során egy 6584 bp hosszú termék jött létre. A szubsztitúciós kazettát a TNO2 A21 törzsbe transzformáltuk és riboflavin prototróf transzformánsokat szelektáltunk, majd "hxnZ frw" és "hxnZ rev" primerekkel végzett PCR-rel tovább szűkítettük a lehetséges deléciós *hxnZ* törzsek számát. A *hxnZΔ* jelöltek totál DNS kivonatát BamHI-gyel emésztettük, és a deletáló kazetta

"A" komponensét (*hxnP* upstream régiója) DNS próbaként jelölve Southern blot analízist készítettünk.

5.27.3.2. *hxnY* deléción

A szubsztitúciós kazetta "A" (2517 bp), "B" (2266 bp) és "C" (2566 bp) komponensei a "hxnY upst frw"- "hxnY upst rev", "hxnY ribo chim frw"- "hxnY ribo chim rev" és "hxnY down frw"- "hxnY down rev" primer párok segítségével készültek el. Az "A", "B" és "C" komponensek összeszerelése és sokszorosítása a "hxnY upst nest frw" és a "hxnY down nest rev" primerek alkalmazásával jött létre. A 6396 bp hosszúságú szubsztitúciós kazettát HZS.120 törzsbe transzformáltuk (5.17. pont) és riboflavin prototróf törzseket izoláltunk. A PCR elő-szelekció ("hxnY frw"- "hxnY rev") során 7 deléciósnek vélhető transzformáns törzset választottunk ki Southern blot analízishez, ahol a BamHI-gyel emésztett totál DNS jelölő próbája ebben az esetben is a gén upstream régiójáról írt PCR termék, azaz a transzformáló kazetta "A" komponense volt.

5.27.3.3. *hxnT* deléción

A deléciós kazetta "A", "B" és "C" komponenseit a "hxnT upst frw"- "hxnT upst rev", a "hxnT paba chim frw"- "hxnT paba chim rev" és a "hxnT down frw"- "hxnT down rev" indítószekvenciák segítségével készítettük el. A 2666 bp, a 3905 bp valamint a 2654 bp hosszú "A", "B" illetve "C" komponenseket templátként használva egy 7535 bp-os összeszerelt PCR terméket hoztunk létre ("hxnT upst nest frw" és "hxnT down nest rev" primerekkel). A kazettát HZS.120 törzsbe transzformáltuk (5.17. pont), és para-amino-benzoésav prototróf telepeket izoláltunk, amelyekből PCR előszelekcióval ("hxnT frw"- "hxnT rev") kiválasztottuk a potenciális deléciós transzformánsokat és azokon Southern analízist hajtottunk végre a totál DNS EcoRI emésztését követően, a "C" komponenst (*hxnT* downstream) jelölve gén próbaként.

5.27.3.4. *hxnP* deléción

A *hxnP* deléciójához a *hxnP*-t két oldalról határoló upstream és downstream régiókat a "hxnP upst frw"- "hxnP upst rev" és "hxnP down frw"- "hxnP down rev" primer párokkal ("A" és "C" termék, 2435 és 2438 bp hosszúak) a vad típusú *riboB*⁺ allélt pedig a "hxnP ribo chim frw"- "hxnP ribo chim rev" (2264 bp hosszú "B" termék) primerekkel sokszoroztuk fel. A kiméra primerek 5' végén lévő 28 nukleotid specifikus a *hxnP*-t határoló régióra. A következő lépésben a három PCR terméket ("A", "B", "C") a "hxnP upst nest frw"- "hxnP down nest rev"

primerekkel egy újabb PCR reakcióban egyesítettük és szaporítottuk, amelyben egy 5878 bp hosszú termék jött létre. A szubsztitúciós kazettát a TNO2 A21 törzsbe transzformáltuk, és piridoxin auxotróf transzformánsokat választottunk ki PCR és Southern ellenőrzésre. A törzsekből totál DNS kivonást végeztünk, és a *hxnP* hiányát, a génre-specifikus "hxnP frw" és "hxnP rev" primerekkel összemért PCR-rel ellenőriztük. Azon törzsek esetében, ahol a reakció során nem történt termékképződés (tehát vélhetőleg *hxnP* deléció), totál DNS EcoRI emésztése után Southern blot analízist is készítettünk a *hxnP* upstream régiójának ("A" komponens) PCR termékét jelölve DNS próbaként. A szubsztitúciós kazetta nukleotid sorrendjét a "hxnR 2F", "hxnR 800F", "hxnR 1375F" és "1958F" primerekkel ellenőriztük.

5.27.3.5. *hxnR* deléció

A *hxnR* deléciójához a homológ rekombinációt biztosító up- és downstream szekvenciákat a "hxnR új up frw"- "hxnR új up Af riboB chim rev" ("A" komponens; 3204 bp) és "hxnR új down Af riboB chim frw"- "hxnR új down rev" ("C" komponens, 2787 bp) primer párok segítségével szaporítottuk fel. A szelekciót biztosító *riboB* gén ("B" komponens, 2607 bp komponens) felszorzozását speciális kiméra primerekkel, "Af riboB hxnR chim frw" és "Af riboB hxnR chim rev"-zel végeztük, amelyek a deletálni kívánt génnel homológ kiméra szekvenciákat tartalmaznak. Annak érdekében, hogy csökkentsük a *riboB*⁺ gén által okozott ektopikus integrációk lehetőségét, *A. nidulans* totál DNS helyett ebben a reakcióban az *A. fumigatus* DNS kivonatát használtuk templákként. A PCR termékek tisztítását követően az "A", "B" és "C" komponensekkel új polimerizációs reakciót mértünk össze 1:2:1 molekula arányban, ahol a komponensek fúziójával összeszerelt molekulát a "hxnR új up nest frw" és "hxnR új down nest rev" indítószekvenciák szaporították fel. A 7611 bp hosszú fúziós terméket a TNO2 A21 törzsbe transzformáltuk (5.17. pont), és riboflavin prototróf transzformánsokat izoláltunk. Ezeket allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalajon teszteltük 1 mM NA inducer jelenlétében, és a *hxnRΔ* fenotípust mutató törzsön (nem tudnak nőni ezen a táptalajon) Southern analízist hajtottunk végre XbaI-el emésztett totál DNS kivonattal, ahol az "A" komponens egy részlete szolgált DNS próbaként.

5.28. A *hxnR* rekonstitúciós törzsek elkészítése

A *hxnR* gén amplifikációját a "hxnR prom NotI frw" és "hxnR term NheI rev" primerpárokkal végeztük el (2. melléklet). A *hxnR* gén teljes ORF, promóter és terminációs régióját tartalmazó PCR terméket tisztítást követően (5.11. pont) pJET vektorba ligáltuk és a klónozott fragmentum szekvenciáját a "hxnR 2F", "hxnR336F", "hxnR 448R", "hxnR800F",

"hxnR1375F" és "hxnR 1985F" primerek felhasználásával ellenőriztük (4. melléklet). A hibátlan fragmentumot NotI-NheI restrikciós endonukleázzal emésztettük és pAN-HZS-1 vektorba klónoztuk át. A vektort HZS.136 és HZS.668 *hxnRA* törzsekbe transzformáltuk, és vizsgáltuk a prototróf törzsek növekedési képességét. A felnövekvő transzformánsokban a *hxnR* kópiaszámát a "hxnR ReTi frw"-"hxnR ReTi rev" és "actin ReTi frw"-"actin ReTi rev" indítószekvenciák alkalmazásával határoztuk meg (3. melléklet), a lókusztintegrációt (HZS.668 esetén) pedig a "hxnR1958F" és "hxnR down seq1rev" primerek alkalmazásával (2. melléklet).

5.29. A HxnR intracelluláris lokalizációjának vizsgálata

5.29.1. C-terminális GFP fúziós konstrukciók létrehozása

5.29.1.1. Natív *hxnR*, *gpd* és *prnD* promóter által meghajtott konstrukciók elkészítése

A natív promóteres konstrukció esetén a *hxnR* gént a "hxnR up nest frw"-"hxnR int NcoI err rev" ("A" komponens-3500 nt) és a "hxnR int NcoI err frw"-"hxnR down seq1 rev" ("B" komponens-1483 nt) indítószekvenciák 2 átfedő termékének felszaporításával hoztuk létre. A "hxnR int NcoI err rev" és "hxnR int NcoI err frw" primerek az NcoI felismerőhelyében 1 nukleotid cserét tartalmaznak, amely azonban nem okoz aminosav (AS) változást a géntermékben. Az "A" és "B" komponenseket egy újabb PCR-ben szereltük össze 3006 nt hosszú molekulává, amelyhez a "hxnR prom NcoI frw" és "hxnR nest link NcoI rev" indítószekvenciákat használtuk fel. A képződött PCR terméket, ami a génen belül nem tartalmaz NcoI felismerő helyet és stop kodont, két végén viszont NcoI felismerő helyet, továbbá egy 9 AS hosszúságú (LIDTVDLDS) linker szekvenciát hordoz, a pAN-HZS-5 vektorba (Karacsony és mtsai., 2014) klónoztuk NcoI-helyre (8. ábra). Az így létrehozott pAN-HZS-8 vektor expresszálja a *pantoB*⁺ marker gént, és a *hxnR-gfp*-t, amelyet a natív *hxnR* promóter hajt meg (8. ábra, B). (A *prnD* promóter ezekben a konstrukciókban nem aktív.) Tapasztalatunk szerint a *hxnR* amplifikációja során a gén rendkívül magas (több mint 58%) GC tartalma miatt a "high fidelity proof reading" polimerázok sem tudják a 2661 nt hosszú kódoló szekvenciát hiba nélkül sokszorozni. Ezért minden esetben, amikor *hxnR* kódoló szekvencia érintve volt egy konstrukció készítésében, akkor azokat végigszekvenáltuk ("1pGpD int frw", "hxnR 800F", "hxnR 1375F", "hxnR 1958F" és "hxnR 336F" indítószekvenciákkal, 4. melléklet). A hibátlan pAN-HZS-8 plazmidból tömény kivonatot (MAXI preparátum, 5.16. pont) készítettünk és az üres pAN-HZS-5 kontroll vektorral (8. ábra) együtt a *hxnRA* (HZS.416; *hxnRA::zeo hhoA-mRFP-AfriboB*⁺ *pantoB100 veA1*) A.

nidulans törzsbe transzformáltuk (5.17. pont), amit előzőleg a *hxnRA::zeo*; *pantoB100*, *veA1* (HZS.136) és a *hhoA-mRFP-AfrigoB pyroA4 pyrG89 riboB2 nkuAΔ::argB⁺ veA1* (HZS.350) törzsek keresztezésével (5.20. pont) hoztunk létre. A HZS.416 törzs H1 hisztonnal fúzionáltatott vörös fluoreszcens fehérjéje (RFP, Red Fluorescence Protein) festési lépések beiktatása nélkül vizualizálja a sejtmagot.

8. ábra: A *hxnR-gfp* konstrukciók és az elkészítésük során használt vektorok sematikus képe

A: A *hxnR-gfp* konstrukciók elkészítéséhez használt alap vektorok sematikus ábrázolása. A pAN-HZS-5 vektort a pAN-HZS-1 vektorból készítettük úgy, hogy a "PpnD *NheI* frw" és "PpnD *NcoI* rev" primerpárokkal felszaporított, 1572 bp hosszúságú *prnD* szekvenciát a *gpdA* promóter *NheI/NdeI* helyére építettük. Ennek eredményeként a vektor egy csonkolt, működésképtelen *gpdA* promótert, és egy működőképes *prnD* promótert tartalmaz. B: A *hxnR-gfp* konstrukciók sematikus képe. pAN-HZS-8: natív *hxnR* promóter által szabályozott konstrukció; pAN-HZS-7: konstitutív *gpdA* promóter által hajtott *hxnR-gfp*; pAN-HZS-6: prolinnal indukálható *prnD* promóteres konstrukció.

A konstitutív promóteres konstrukció összeépítéséhez az előzőekben elkészített "A" és "B" komponenst használtuk fel, de a fúziós PCR során a "hxnR nest NcoI frw" és "hxnR nest link NcoI rev" primerpárokat alkalmaztuk. A konstrukciók elkészítése során alkalmazott primerek szekvenciáit az 5. melléklet tartalmazza. A *hxnR* promótert nem tartalmazó 2700 bp hosszú PCR terméket a pAN-HZS-1 vektor NcoI helyére klónoztuk (8. ábra, B panel, pAN-HZS-7). Az esetleges polimeráz által okozott mutációkat ebben az esetben is a megfelelő konstrukciót hordozó plazmid inszertjének szekvenálásával ellenőriztük ("hxnR 2F", "hxnR 800F", "hxnR 1375F", "hxnR 1958 F" és "hxnR 101R" primerekkel, 4. melléklet). Ezt követően is egy tömény plazmid kivonatot készítettünk, amelyet a pAN-HZS-1 kontroll vektorral együtt a HZS.416 deléciós *hxnR* törzsbe transzformáltuk. A továbbiakban az előző konstrukciónál leírtak alapján jártunk el. A transzformások közül mindkét esetben minimál táptalajon válogattuk ki a pantoténsav prototróf törzseket. Totál DNS kivonást követően a transzformánsokban a *hxnR-gfp* kópiaszámát qPCR eljárással határoztuk meg a "hxnR ReTi frw"- "hxnR ReTi rev" és "actin ReTi frw"- "actin ReTi rev" indítószekvenciák alkalmazásával (3. melléklet).

A *prnD* promóterrel meghajtott *hxnR-gfp* konstrukció (pAN-HZS-6) építéséhez is a pAN-HZS-7 vektor elkészítéséhez használt A+B PCR terméket klónoztuk a pAN HZS-5 vektor NcoI helyére (8. ábra, B panel). A prolinnal indukálható *hxnR-gfp*-t expresszáló vektort, valamint az üres pAN-HZS-5 kontroll vektorokat *hxnRA* (HZS.416) és *prnD* *A. nidulans* mutáns törzsbe (HZS.543: *hxnRA::zeo*, *hhoA-mRFP-AfriboB*⁺, *prnD*⁻, *pantoB100*, *veA1*) transzformáltuk (5.17. pont), amit a *prnD* *pabaA1 yA2 veA1* (HZS.487) és *hxnRA::zeo hhoA-mRFP-AfriboB*⁺ *pantoB100 veA1* (HZS.416) törzsek keresztezésével (5.20. pont) állítottunk elő.

5.29.1.2. Lókuszt integrációt biztosító konstrukció építése

A vektort a pAN-HZS-7 vektor módosításával, a Double-Joint PCR módszer felhasználásával hoztuk létre. A markert az "Afu riboB frw"- "Afu riboB hxnR down chim rev" indítószekvenciákkal amplifikáltuk (2689 bp, "A" komponens), majd a "hxnR down Afu riboB chim. frw"- "hxnR down rev" primerek termékével (2436 bp, "B" komponens), az *A. nidulans hxnR* gén downstream szekvenciájával építettük össze. A fúziót az "Afu riboB NdeI frw"- "hxnR down nest NdeI rev" indítószekvenciákkal végeztük. A 4318 bp amplikont egy segédklónozási lépésen keresztül (pJET vektorba ligáltuk EcoRV helyre a blunt-end PCR terméket, majd NdeI hasítással visszanyertük és gélről izoláltuk az inszertet), NdeI hasított pAN-HZS-7 vektorba klónoztuk a *pantoB* gén helyére. A vektor BspHI restrikciós

endonukleáz hasítását követően a lineáris molekulát a HZS.351 (*hhoA-mCh-AfPyrG⁺ riboB2 pyrG89 pyroA4 nkuAΔ::argB⁺ argB2 veA1*) törzsbe transzformáltuk (5.17. pont), amely a vad típusú *hxnR* gént hordozza és a H1 hisztonnal fúzionáltatott vörös *mCherry* fluoreszcens protein a sejtmag detektálását biztosítja. Ez a recipiens törzs *nkuAΔ*, amely az *nkuA* géntermék hiányában nem képes nem-homológ végek összekapcsolására, ezért ebben a törzsben az ektopikus integrációnak a lehetősége rendkívül csekély. qPCR-rel ("hxnR ReTi frw"- "hxnR ReTi rev" és "actin ReTi frw"- "actin ReTi rev" primerpárokkal, 3. melléklet) kiválogattuk a *hxnR*-t egy kópiában tartalmazó transzformánsokat, majd ezen törzsek totál DNS kivonatát XhoI/BspHI-el emésztéstettük és Southern- hibridizációt végeztünk rajtuk (5.19. pont). A hibridizációhoz jelölt póbaként a *hxnR* downstream szekvencia szolgált ("hxnR down frw"- "hxnR down seq 1 rev" primerek terméke).

5.29.2. N-terminális GFP fúziós konstrukciók elkészítése

Double-Joint PCR technikával 5 komponensű szubsztitúciós kazettát hoztunk létre, amelyben a kazetta "A" komponense a *hxnR* ORF régiójától upstream elhelyezkedő *hxnP* (2288 bp, "hxnP frw2"- "hxnP rev2"), a "B" komponens az *A. fumigatus* genomjából a "hxnP Af panto chim frw" és "Af panto rev" indítószekvenciákkal felszaporított *pantoB⁺* szelekciós marker gén (2476 bp), míg a "C" komponens a *hxnR* natív promótere (668 bp), aminek sokszorozását a "hxnR prom frw" és "hxnR prom rev" szekvenciákkal indítottuk. A "D" komponens, a *gfp* (944 bp), a "hxnR prom GFP chim frw" és "GFP rev" primerek alkalmazásával készült. Az utolsó, "E" komponens a *hxnR* ORF első 2113 bp-ja, amit a "hxnR SmaI frw" és "hxnR XbaI rev" indítószekvenciákkal szaporítottunk fel. (A primerek szekvenciái az 5. mellékletben olvashatók). Az "A-E" elemek sokszorozását követően az "E" komponenst pJET vektorba ligáltuk, és a "hxnR 336F", "hxnR 448R", "hxnR 800F", "hxnR 1375F" és "1958F" primerekkel szekvenálással győződünk meg arról, hogy az amplikon felsokszorozása közben a polimeráz nem vétett hibát. A hibátlan szekvenciát SmaI/XbaI emésztést követően, SmaI/XbaI hasított pBluescript II SK plazmidba klónoztuk át. A konstrukció építést a különálló "A", "B", "C" és "D" elemek összepítésével folytattuk. Elsőként az "A" és "B" komponens tisztított PCR termékét mértük új, fúziós reakcióba, a "hxnP int frw" és "Afu panto int rev" indítószekvenciákkal (4509 bp "AB" termék), majd a "C" és "D" elemek összeépítését végeztük el, amihez az "Afu panto hxnR prom int chim frw"- "GFP int rev" primer szekvenciákat használtuk fel ("CD" termék, 1151 bp). Végül pedig az "AB" és "CD" amplikonokat egyesítettük a "hxnP int KpnI frw"- "GFP int linker HpaI rev" primerekkel. Utóbbi primerbe egy, az előző konstrukciónál használt szekvenciától eltérő, 8

aminosav hosszúságú linker szekvenciát (Morozov és mtsai., 2010) építettünk (beépülést követően a szekvenciáját az "hxnP Reti rev" és "5 Gfp NcoI start frw" primerekkel ellenőriztük, 3. és 4. melléklet). Az egymást követő PCR-ek sorozatával létrehozott "ABCD" 5435 bp hosszú szekvenciát végül az "E" komponenst tartalmazó KpnI/SmaI emésztett pBluescript II SK vektorba ligáltuk. A cirkuláris plazmidot (a konstrukció szelekcióját biztosító marker gént figyelembe véve) *hhoA-mRFP-AfriboB⁺ pantoB100 pyroA4 veA1* (HZS.622) törzsbe transzformáltuk (5.17. pont).

9. ábra: N-terminális *gfp-hxnR* konstrukció sematikus ábrázolása

"A" komponens: a *hxnR* ORF régiójától upstream elhelyezkedő szekvencia (*hxnP*), "B" komponens: az *A. fumigatus* genomjából származó *pantoB⁺* szelekciós marker gén, "C" komponens: a *hxnR* natív promótere, "D" komponense a *gfp* ORF stop kodon nélkül, "E" komponens: a *hxnR* ORF első 2113 bp-ja.

Az "Afu pantoB Reti frw"-"Afu pantoB Reti rev" és "actin ReTi frw"-"actin ReTi rev " primerekkel (3. melléklet) qPCR-t végeztünk, és meghatároztuk a kazetta integrációs eseményeinek a számát. További PCR-rel ("GFP3' int. frw"-"hxnR ell.2 rev2" primerekkel) azt is ellenőriztük, hogy a *hxnR* gén saját lókuszába történt-e rekombináció. A lókusz integrált transzformánsokban a *hxnR* szekvencia pontos helyreállítását úgy ellenőriztük, hogy a "gfp-hxnR kazetta XbaI frw"-"gfp-hxnR kazetta XbaI rev" primerpárokkal amplifikáltuk a kazettát és a teljes *hxnR* szekvenciát, majd szekvenálással ellenőriztük a nukleotid sorrendet az "Afu pantoB ReTi frw", "hxnR XbaI frw", "hxnR 336F", "GFP3' int rev", "GFP ReTi frw", "hxnR 800F" "hxnR 1375F", "hxnR 1958F" és "hxnR Cl rev" primerpárokkal.

5.30. Mikroszkópos preparátumok készítése

A mikroszkópos preparátumok elkészítéséhez a fedőlemezeket 10 ml, minimál tápoldatba süllyesztettük, majd ezek felületére 10⁴ db konídiumot cseppentettünk, amelyeket 37 °C-on, nitrogénforrástól függően 5-8 órán keresztül inkubáltunk. A fedőlemezekon kicsírázott tenyészeteket Olympus FV1000 konfokális lézer szkennelő mikroszkópban vizsgáltuk.

5.31. In silico analízisek során felhasznált módszerek

A disszertáció elkészítése során felhasznált szekvenciákat a <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, <http://www.aspgd.org/> és a <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf> adatbázisokból gyűjtöttük össze. A szekvencia illesztéseket a MAFFT E-INS-i és MAFFT G-INS-i programokkal végeztük, míg az illesztések színezéséhez a BOXSHADE-et (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) használtuk. A lokalizációs szignál szekvenciákat a <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP> (Emanuelsson és mtsai., 2000), <http://www.peroxisomedb.org> (Schluter és mtsai., 2010), http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi (Kosugi és mtsai., 2009), <http://wolfsort.org> (Horton és mtsai., 2007), és <http://genome.unmc.edu/ngLOC/cite.html> (King és Guda 2007) programok felhasználásával azonosítottuk. A strukturális analízisek és modellezések a SWISS-PDBVIEWER (Guex és Peitsch, 1997), az I-TASSER, (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER> (Zhang, 2008; Roy és mtsai., 2010) és a VMD 1.9. (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) (Humphrey és mtsai., 1996) programok használatával készültek. A 3D struktúrák egymásra helyezését a VMD-be épített MultiSeq-kel (Roberts és mtsai., 2006) végeztük. A mutációk azonosításához a DNA Baser, a Multiple Sequence Alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Edgar, 2004) és EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq) programokat használtuk.

6. Eredmények és értékelésük

6.1. A HxnS-t kódoló gén azonosítása

A kozmid transzformálással létrehozott HZS.106 és HZS.122 keresztezéséből származó *hxnSΔ::zeo biA1 pyr4 veA1* (HZS.254) törzs létrehozását követően a deléciós törzs növekedési képességét összevetettük a Prof. C. Scazzocchio által rendelkezésünkre bocsájtott három létező, vélhetően *hxnS* mutánssal (*hxnS29*, *hxnS35* és *hxnS41*). A *hxnSΔ* törzs, akárcsak a *hxnS35* és *hxnS41* mutánsok, elvesztette növekedési képességét az allopurinollal (PHI gátlószere) és 6-NA inducerrel kiegészített hipoxantin táptalajon, míg 6-NA nitrogén forráson telepet alkotott. A *hxnS29* az első két táptalajon enyhe "leaky" növekedést mutatott (10. ábra, C panel). Ezt követően *in vitro* enzimaktivitás vizsgálatot végeztünk (5.26. pont, 10. ábra), amivel kimutattuk, hogy a *hxnS35*, *hxnS41* és *hxnSΔ* mutánsok nem rendelkeznek PHII aktivitással, ezzel szemben a *hxnS29* törzsben PHII aktivitást detektáltunk mind NA, mind pedig hipoxantin szubsztráton (10. ábra, B panel). A mutánsok totál DNS-kivonatát templatként használva, szekvenálással azonosítottuk a *hxnS* génben történt nukleotid változásokat (5.25. pont). A *hxnS35* egy 5 bp hosszú delécia a 182-es és 185-ös DNS pozíció között, ami *non-sense* mutációt okoz a 98. aminosavban. A *hxnS41* két mutációt hordoz: G3064T nukleotid cserét és a 3066. nukleotid delécióját, ami lánc terminációt idézett elő a 1162. pozícióban (10. ábra, D panel). A *hxnS29*-ben T3668C mutációt azonosítottunk, ami F1213S változást eredményezett az enzim konzervált régióján belül (10. ábra, D panel, 6.2. pont). Míg a *hxnS35* és *hxnS41* mutációi a PHII enzim működését teljes mértéken gátolták, addig az *in vivo* kísérletek a *hxnS29* mutációja esetén csökkent enzimműködésre utaltak. Az *in vitro* kísérletekben a *hxnS29* a *hxnS⁺* kontrollal azonos enzimműködést mutatott. Ezek alapján azt gondoljuk, hogy az F1213S mutáció valószínűleg a fehérje stabilitására, nem pedig az aktivitására hathat. A három mutáns és a deléciós törzs fenotípusa formális bizonyítékot jelentenek arra, hogy a PHII (továbbiakban HxnS) enzimet a *hxnS* gén kódolja.

10. ábra: A *hxnS*⁻ mutánsok fenotípusa

A: Enzim aktivitás festés hipoxantin és NA szubsztráttal. A HxnS (PHII) 6-NA-val indukálható, de az indukálhatósága függ a *hxnR* fehérjétől (Ámon és mtsai., 2017). A HxnS-t jelölő sáv alacsonyabb mobilitású a HxA-t (PHI) jelölő sávnál és festhető NA szubsztráttal. Az "acam" rövidítés a tenyésztés során használt 1 mM acetamid nitrogénforrást jelöli. A tenyészeteket 37 °C-on 15 órán keresztül inkubáltuk, majd esetenként 1 mM 6-NA-val indukáltunk. Az "urea" 5 mM ureán történő növesztést jelent, ahol az indukációs körülményt 600 μM húgysav hozzáadása biztosította. B: három *hxnS* mutáns PHII aktivitása. Mindhárom törzset a HxnS kifejeződését indukáló körülmény között neveltük. A *hxnS29* törzs *in vitro* enzimaktivitást mutatott. C: *hxnS*⁻ mutációk növekedési fenotípusa. D: A kísérlet során használt törzsekben bekövetkezett mutációk felsorolása. Az *hxnS35*, *hxnS41* és *hxnS29* mutánsok izolálását Scazzocchio és mtsai. írták le 1973-ban (Scazzocchio és mtsai., 1973).

6.2. A PHI (HxA) és PHII (HxnS) összehasonlítása

A HxA és HxnS valamint ezek gombákban azonosított ortológjai (mintegy 500 ortológ, elérhető az Ámon és mtsai 2017 „Supplementary materials: Supplementary Table 1”-ben) kevésbé különböznek egymástól, mint más eukarióta XDH paralógok, így a szekvenciáikban fellelhető különbségek választ adhatnak funkcióbeli eltérésekre (Garattini és mtsai., 2008; Mahro és mtsai., 2013).

A *hxnS* intron szekvenciáinak kijelölését követően, a HxnS szekvenciáját összehasonlítottuk az *A. nidulans* PHI (HxA) és a korábban már kémiai és szerkezeti is jól jellemzett *Bos taurus* XDH enzimével (Enroth és mtsai., 2000; Okamoto és mtsai., 2013). A MAFFT E-INS-i illesztőprogram felhasználásával a *B. taurus* enzim kristályszerkezetében azonosított két amino terminális 2Fe/2S klaszter, a FAD és NAD kötő helyek szigorúan konzerváltak mind a HxnS-ben és a HxA-ban (11. ábra). A HxnS, összevetve a HxA-val és más jellemzett xantin dehidrogenázzal, több inszerciót is tartalmaz. Az első beékelődés a második 2Fe/2S klaszter második és harmadik Cys aminosava között történt. Így a 2Fe/2S klasztert és a FAD/NAD kötő domént összekötő szekvencia lényegesen hosszabb a HxnS-ben a HxA-hoz képest, mely utóbbi inkább a *B. taurus* XDH-hoz hasonlít. A FAD/NAD doménon belül, a *B. taurus* XDH 417. pozíciójában lévő fenilalanin a XDH-okat tekintve általánosan egy aromás terület (Tyr454 HxA-ban), de HxnS-ben ez Ile (Ile478), és a HxnS vélhető ortológjaiban is mindig alifás hidrofób aminosav (11. ábra). A karboxi terminális Moco/szubsztrát kötő domén (*B. taurus* XDH-ban az 590. aminosavtól kezdődően) teljes konzerváltságot mutat mind a Moco-val, mind pedig a szubsztráttal való kölcsönhatásban. A *B. taurus* XDH-ban az Arg880 konzervált régió (Arg911 HxA-ban és Arg934 HxnS-ben) soha nem konzervált a XDH-szerű aldehid oxidázokban. Ezen AS mutációja HxA-ban (R911Q és R911G) megváltozott szubsztrátspecifitást eredményeztek (a xantint nem tudja nitrogénforrásként felhasználni), valamint az allopurinol gátlószer hatása megváltozik és PHII-szerű rezisztencia alakul ki (Sealy-Lewis és mtsai., 1978; Glatigny és mtsai., 1998). A *B. taurus* enzim Glu803 szintén konzervált HxA-ban (Glu833) és HxnS-ben (Glu856) is, de ezek nem konzerváltak a XDH-szerű aldehid oxidázokban. Számos „missense” funkcióvesztéses mutánst és módosult specificitást mutató mutánst azonosítottak, amelyben a mutáció a HxA Moco/szubsztrátkötő doménjében történt (Glatigny és mtsai., 1998). Ezek a régiók konzerváltak HxnS-ben és ortológjaiban.

XDH <i>Bos taurus</i>	1	M	-----TAD-----	EIVFVNKKVVEKNAPETL	AVARKLGRGKIKGEGG	GAIVVSKYDRLODK	IFSNIA	APL	CTLHHVAVI	AVE
HxA (PHI)	1	M	MAPGVLLQPSOSEIEAAPPKAAASLLQLTEEMDDT	REFYNGKVI	LDSDPE	TLLELRG	I	GLT	GLKLG	EGG
HxnS (PHII)	1	M	-----DALPSPSP-----	QKQKYLNGTIP	LS	TPSP	PPRWLLD	FTBS	ODGL	KTKLKGEGG
	90		GTGSTKTLRHVPQER	AKSHGS	GF	HPGIVMS	WTL	LRNOBET	VEET	IEDA
	120		GLGNVNP	HAI	QOR	AI	GNGS	GF	HPGI	VMSLYAM
	198		GLGTVDPHP	HPL	QER	AI	GNGS	GF	HPGI	VMSLYAM
	214		SRSSGSGP	GGCK	KD	SP	SS	SRETDM	IP	SP
	167		GGCGGNGNPN	CCNKK	KD	HI	VT	SP	SP	SP
	198		CGKAA	NGS	GG	EE	OK	GT	NG	CG
	214		SRSSGSGP	GGCK	KD	SP	SS	SRETDM	IP	SP
	276		PVI	I	CP	AVP	IP	NA	VE	UG
	313		GS	AV	VE	UG	DA	EA	OA	VP
	331		SV	VE	UG	DA	EA	OA	VP	SP
	391		P	S	R	K	T	L	G	P
	427		RE	V	R	S	T	A	L	P
	450		K	E	V	R	T	A	L	P
	507		F	R	T	L	S	F	F	K
	544		Y	R	T	L	S	F	F	K
	570		Y	R	T	L	S	F	F	K
	627		K	V	P	G	E	C	E	L
	655		E	I	P	G	V	T	D	V
	676		E	I	P	G	V	T	D	V
	740		D	H	X	E	T	H	C	T
	771		E	H	E	T	H	C	T	A
	794		E	H	E	T	H	C	T	A
	860		E	V	D	H	S	N	A	G
	891		D	A	D	V	A	N	G	H
	914		D	A	D	V	A	N	G	H
	979		A	R	K	E	T	E	R	S
	1010		E	R	K	A	V	E	E	N
	1034		A	R	K	E	T	E	R	S
	1098		L	K	R	L	E	F	K	K
	1129		N	E	R	L	N	E	R	K
	1154		N	E	R	L	N	E	R	K
	1214		S	P	-	E	R	S	-	E
	1245		H	R	T	I	G	O	L	I
	1274		T	R	-	S	O	L	A	T
	1327		P	A	S	L	I	R	-	
	1358		S	F	F	A	L	-		
	1390		G	F	E	V	A	-		

11. ábra: PHI (HxA) és PHII (HxnS) összehasonlítása

Az *A. nidulans* HxA és HxnS fehérjék aminosav szekvenciáinak összehasonlítása a *B. taurus* XDH-al (Enroth és mtsai., 2000). Aláhúzott szekvenciák: sárga: 2Fe/2S csoport; kék: FAD/NAD kötő domén; piros: Moco/szubsztrátkötő alegység I és II (Hille, 2005); piros nyíl: a *hxA* gén intron pozíciói; zöld nyíl: a *hxnS* gén intron pozíciói. Bekeretezett részek: sárga: konzervált Cys a 2Fe/2S csoporton belül, a 2Fe/2S hurokhoz tartozó Glu45 és Gly46 AS-ak, továbbá elválasztja ezt a klasztert a flavin kötő gyűrűtől; narancssárga: FAD kötő hely (Enroth és mtsai., 2000); kék: NAD⁺/NAD kölcsönható helyek (Ishikita és mtsai., 2012); zöld: Moco-val kölcsönható helyek; piros: feltehetően funkcionális fontos helyek, ahol a HxnS és feltételezett ortológjai különböznek mind a HxA-tól mind pedig a *B. taurus* által képviselt tipikus XDH-októl. Piros csillag a *B. taurus* XDH szubsztrátkötő helyei; kék csillag a *B. taurus* XDH azon AS-ait jelölik, amik a szubsztrát befogadó csatornát formálják meg. Piros, lefelé mutató nyilak: mutációk, amik következtében a HxA teljesen elvesztette funkcióját. Kék, lefelé mutató nyilak: azok a mutációk, amelyek miatt megváltozott a HxA szubsztrát és inhibitor specifikációja (Glatigny és mtsai., 1998). Zöld nyíl: a HxnS egyetlen létező „missense” mutáns allél mutációja.

Mivel a HxnS paralóg a HxA-val (egy ősi HxA duplikációjával majd mutálódásával jött létre), szeretnénk megtalálni azokat a kulcs-változásokat, aminek köszönhetően a HxnS szert tett különleges, NA kötő és hidroxiláló képességére. Ennek felderítésére átvizsgáltunk minden eltérést mutató AS-at, amit a HxA és HxnS összehasonlításakor láttunk, és közülük csak kevés számú változás mutatott teljes konzervációt a 124 HxnS ortológ között. Ezek közül a legfeltűnőbb eltérés egy Ala inszerciója (Ala1065 az HxnS-ben) a csaknem szintén konzervált Phe1009 és Thr1010 (*B. taurus*) közé (ez Phe1040 és Thr1041 HxA-ban, Phe1064 és Thr1066 HxnS-ben). Ez a Phe/Thr pár a bakteriális XDH-okban (459 és 460 a *Rhodobacter capsulatus* XDH-ban) is konzervált (Truglio és mtsai., 2002). A HxA Phe1044 aminosava erősen konzervált a xantin dehidrogenázokban (*B. taururs* Phe1013), de ez a HxnS-ben és ortológjaiban His (H1069).

6.3. A *hxnR/aplA* gén azonosítása és jellemzése

Az *Aspergillus* adatbázis alapján a *hxnS* közel helyezkedik el egy 865 aminosav hosszúságú proteint kódoló szekvenciához (2673 nt, AN11197), ami transzkripció faktorokra jellemző két Cys2His2 típusú Zn-ujj motívumot tartalmaz az N-terminális közelében. Szerepének vizsgálata céljából kozmid transzformálással külföldi kollaborációs munkatársaink deletálták a teljes leolvasási keretét (5.27.2. pont). A mutánsok által mutatott fenotípus megegyezett a korábban leírt *hxnR2* mutáció fenotípusával (Scazzocchio és mtsai., 1973; Scazzocchio, 1994; Hanselman, 1985), azaz nem képesek sem NA-t, sem a 6-NA-t nitrogénforrásként hasznosítani (6.7. pont, 26. ábra), és PHII enzimaktivitással sem rendelkeznek (10. ábra, A panel). Nitrogénforrás hasznosítási tesztekkel kimutattuk, hogy a vad típustól eltérően a bakteriális NA katabolikus útvonalakból ismert 2,5-DP-t sem tudják nitrogénforrásként felhasználni, ami igazolta, hogy az *A. nidulans*-ban ez a vegyület is a lebontási útvonal egyik metabolitja (6.7. pont, 26. ábra). A NA és 6-NA mellett a 2,5-DP is alkalmazható volt inducerként már akár 100 μ M mennyiségben hozzáadott, allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalajon (6.7. pont, 26. ábra).

A *hxnR* leolvasási keretében két lehetséges iniciációs kodon létezik, amelyek három AS-val szeparálódnak el egymástól (MKAKM) (13. ábra). Más, adatbázisokban elérhető *Aspergillus* fajok szekvenciájában azonban csak a második Met kodon van jelen. Mivel az első kodon az átírt szekvencián belül helyezkedik el (RNS szekvenálási adatok, <http://www.aspgd.org/>), azt feltételezzük, hogy az *A. nidulans*-ban ez a valódi start kodon.

A 394 és 668 AS-ak között egy PF04082 PFAM domént (gomba-specifikus transzkripciós faktor domén) azonosítottunk (12. ábra, A panel). A cNLS mapper program segítségével a Zn-ujj doméntól "downstream" irányban elhelyezkedő, több bázikus aminosavat tartalmazó lehetséges nukleáris lokalizációs szignál (NLS) szekvenciát (VLRTRKMRRA) azonosítottunk, a NetNES program segítségével pedig egy hidrofób aminosavakban gazdag, nukleáris export szignált (LDIDL), ami a 285-289 AS-ak között található (12. ábra, A panel).

12. ábra: A HxnR transzkripciós faktor vázlatos ábrázolása, és a *hxnR^c* mutánsok konstitutivitásának igazolása enzimaktivitás festéssel

A: Sötétzöld téglalapok: Cys2His2 Zn-ujj domének; kék téglalap: gomba-specifikus transzkripciós faktor domén (PF04082); citromsárga téglalap: putatív NLS; narancssárga téglalap: putatív NES; világoszöld téglalapok: azon 2 régió, ahol a konstitutív mutációk létrejöttek. A séma alatt részleteztük az összes olyan AS változást, amely az adott régióban konstitutivitást okoztak. Pirossal a 3 létező, funkcióvesztéssel járó mutációt jelöltük. B: A konstitutív mutánsok enzimaktivitás festése. NA szubsztráttal csak az alacsonyabb mobilitással bíró HxnS festődik. Nem indukív körülmények között növesztett vad típusú törzsben (*hxnR⁺*, *hxA⁺*) a festések során HxnS jel nem figyelhető meg, míg a HxA jelentős aktivitást mutat, ahogy azt Scazzocchio és Darlington már korábban leírta (Darlington és Scazzocchio, 1968; Scazzocchio és mtsai., 1973). A különböző *hxA* háttérből származó (*hxA18*, *hxAΔ*, *hxA⁺*) konstitutív *hxnR* törzseket is megfestettük. Mindegyik mutáns nem indukáló körülmények (a tápoldat sem a HxA sem pedig a HxnS számára nem tartalmazott indukáló szert) között neveltük fel, 1 mM acetamid nitrogénforráson, 15 órán keresztül, 37 °C-on.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, melyek azok a domének a *hxnR* génen belül, amelyek a fehérje aktivitásáért felelősek, az egyetlen létező konstitutív mutáns (*aplA*^{c7} (Scazzocchio és mtsai., 1973), későbbiekben *hxnR*^{c7}) mellé további konstitutív mutáns törzsek előállítását céloztuk meg. Konstitutív mutánsokat UV mutagenézissel hoztunk létre (5.24. pont), amiket az UV besugárzást követően allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalajon szelektáltuk NA vagy 6-NA inducer jelenléte nélkül. Ezen a direkt szelekciós táptalajon életképes törzsekből az 5.25. pontban részletezett módon amplifikáltuk a *hxnR* ORF-et és szekvenálással azonosítottuk a konstitutivitást okozó mutációkat. Mivel mind a funkcióvesztéses, mind a konstitutív mutációk (*alpA*^c mutációk, lásd a "Irodalmi áttekintés" fejezetet) a *hxnR* leolvasási keretén belül térképeződnek (12. ábra, A), ezért a konstitutív mutációkat átneveztük *aplA*^c-ről *hxnR*^c-re. A 12. ábrán az összes létező funkcióvesztéses és konstitutív mutációt bemutatjuk, míg a mutációkat és a törzsek eredetét a 2. táblázatban részletezzük. A mutánsokban a HxnR konstitutivitását a HxnS enzim aktivitás vizsgálatán keresztül igazoltuk mind hipoxantin, mind pedig NA szubsztrátokon (12. ábra, B panel).

2. táblázat: A *hxnR* és *hxnS* szekvenálással azonosított új funkciót nyert vagy funkciót veszített alléljai.

<i>hxnR</i> vagy <i>hxnS</i> allélok	Törzs név	Szülői törzs	Nukleotid változás	Aminosav változás
<i>hxnR</i> ^{c100}	HZS.354	HZS.248	T751G	Y226D
<i>hxnR</i> ^{c101}	HZS.355		T757C	W228R
<i>hxnR</i> ^{c102}	HZS.452		C730G	P219A
<i>hxnR</i> ^{c103}	HZS.453		A1883C	K603T
<i>hxnR</i> ^{c104}	HZS.454		T751G	Y226D
<i>hxnR</i> ^{c105}	HZS.455		T751G	Y226D
<i>hxnR</i> ^{c106}	HZS.456		T751G	Y226D
<i>hxnR</i> ^{c107}	HZS.457		T751G	Y226D
<i>hxnR</i> ^{c108}	HZS.458		G1884T	K603N
<i>hxnR</i> ^{c109}	HZS.459		T751A	Y226N
<i>hxnR</i> ^{c110}	HZS.460		T757C	W228R
<i>hxnR</i> ^{c150*}	HZS.461		G784T, G787C	D237Y, A238P
<i>hxnR</i> ^{c151*}	HZS.462		G1884T	K603N
<i>hxnR</i> ^{c152*}	HZS.463		T751A	Y226N
<i>hxnR</i> ^{c200}	HZS.464	HZS.98	T764C	F230S
<i>hxnR</i> ^{c201}	HZS.465		T757C	W228R

<i>hxnR</i> vagy <i>hxnS</i> allélok	Törzs név		Nukleotid változás	Aminosav változás
<i>hxnR</i> ^c 202	HZS.466	HZS.418	T751G	Y226D
<i>hxnR</i> ^c 203	HZS.467		A1882G	K603E
<i>hxnR</i> ^c 300	HZS.468		C731T	P219L
<i>hxnR</i> ^c 301	HZS.469		T757C	W228R
<i>hxnR</i> ^c 302	HZS.470		T764C	F230S
<i>hxnR</i> ^c 303	HZS.471		T757C	W228R
<i>hxnR</i> ^c 304	HZS.472		A1894C	T607P
<i>hxnR</i> ^c 305	HZS.473		T1769C	F565S
<i>hxnR</i> ^c 306	HZS.474		A752C	Y226S
<i>hxnR</i> ^c 307	HZS.475		G758C	W228S
<i>hxnR</i> ^c 308	HZS.476		T791C	F239S
<i>hxnR</i> ^c 309	HZS.477		T1769C	F565S
<i>hxnR</i> ^c 310	HZS.478		T763A	F230I
<i>hxnR</i> ^c 311	HZS.479		A754G	N227D
<i>hxnR</i> ^c 7**	FGSCA872	FGSC A26	G1884T	K603N
<i>hxnR</i> ^c 48**	CS51.2		C1990T	R639C
<i>hxnR</i> 2**	CS302	A148	G227A	G76D
<i>hxnR</i> 3**	CS302.2		G1833A	W578STOP
<i>hxnR</i> 80***	HZS.220	TNO A21	A244G	K82E
<i>hxnS</i> 29**	HZS.113	HZS.102	T3668C	F1213S
<i>hxnS</i> 35**	HZS.110		(182-185)Δ	98STOP
<i>hxnS</i> 41**	HZS.109		G3064T; 3066Δ	1162STOP

A csillagok a mutagenézis típusára utalnak: * 4-NQO (4-nitrokinolin-N-oxid) mutagenézis, ** MNNG (metil-nitro-nitrozoguanidin), *** PCR-rel létrehozott mutációk. A csillag nélküli törzseket UV mutagenézissel hoztuk létre. Laborunkban az UV és a PCR-rel létrehozott mutánsokat izoláltuk, míg az MNNG és 4-NQO mutánsokat Prof. C. Scazzocchio szelektálta. Az azonos pozícióban történt változásokat a táblázatban azonos színnel jeleztük.

Mivel néhány mutációt többször is sikerült azonosítani egymástól független mutánsokban, úgy gondoltuk, hogy a mutagenézis kísérlet során elértük a *hxnR* gén konstitutív mutációinak szaturációját. Elkészítettük a fehérje CONSURF modelljét, amelyhez 123 lehetséges ortológot választottunk a Pezizomycotina fajok közül (6. melléklet) (13. ábra).

13. ábra: A *hxnR* 123 vélhető ortológjaival végzett CONSURF analízis eredménye

Az illesztés a MAFFT, E-INS-i algoritmusával történt. A funkcióvesztéses mutációkat a piros háromszögek, a funkciónyeréses mutációkat a zöld háromszögek mutatják. Narancssárga "e" az algoritmus szerint a külső felszínre lokalizálódó aminosavakat, a zöld "b" az algoritmus szerint takarásban lévő aminosavakat, a piros "f" a funkció, míg a kék "s" a szerkezet szempontjából fontos aminosavakat jelölik. A citromsárga "x" a predikcióhoz elégtelen adatokat jelzik.

Szinte minden funkcióvesztést vagy konstitutivitást okozó mutáció erősen konzervált régióra térképeződött. A konstitutív mutációk két területre estek (11. és 12. ábra), a 219 és 239 AS-ak által körülhatárolható régióban, valamint a karboxi terminálison az 565 és 639 AS-ak közötti régióban (12. és 13. ábra). Több AS pozíció esetén is előfordult, hogy egy pozíción belül az AS többféle AS-ra is változhatott, ami konstitutivitást eredményezett. A változások alapján azt feltételezzük, hogy a 226. és 228. pozícióban aromás AS-nak, a 605. pozícióban pedig bázikus AS-nak kell lenni ahhoz, hogy a protein fiziológiailag inaktív állapotban legyen a valódi inducer megjelenéséig (2. táblázat).

A CONSURF modell alapján elkészítettük a fehérje 3D képét (I-Tasser alkalmazásával), és jelöltük a funkciónyerést és a funkcióvesztést okozó mutációk helyét, amelyek a modellen a fehérje külső felszínén, egymással szemben helyezkednek el (14. ábra).

14. ábra: A HxnR 3D modellje, és a mutációk térképezése

A funkciónyerést, illetve -vesztést okozó mutációk jól elkülönülve, 2 régióban csoportosulnak a fehérje külső felszínén, egymással szemben lokalizálódva.

6.4. Egy szorosan konzervált génklaszter felfedezése a VI. kromoszómán

Az, hogy a *hxnR* és a *hxnS* gének csaknem egymás közvetlen közelében helyezkednek el, felvetette a lehetőségét annak, hogy ezek a gének egy, a NA metabolizmusban résztvevő, koregulált géncsoport tagjai. A hipotézis megerősítése céljából sorra elemeztük a *hxnS* és *hxnR* környezetében található gének expressziós mintázatát *hxnR*⁺ (FGSC A26), *hxnRA* (HZS.136) és *hxnR*^{c7} (FGSC A872) törzseken végzett qRT-PCR analízissel (az alkalmazott primerek a 3. mellékletben találhatóak). A *hxnS* és *hxnR* környezetében számos gén mutatott koregulációt, ami alapján egy 6 génből álló génklasztert azonosítottunk a VI. kromoszómán (15. ábra, C panel).

15. ábra: A *hxn* klaszter gének koregulációja

A: A *hxn* klaszter gének relatív mRNS szintje. Az RNS kivonáshoz a micéliumokat nem indukáló (NI), indukáló (I) vagy indukált-represszált (IR) körülmények között tenyésztettük. Az inkubáció első 8 órájában a tápoldat egyedüli nitrogénforrásként a neutrális acetamidot (1 mM) tartalmazta. A következő 2 órában a tenyészeteket vagy ugyanebben a tápoldatban ráztuk tovább (NI-nem indukált), vagy a tenyésztő elegyet 1 mM NA-val (I-indukált) vagy 1 mM NA-val és 5 mM ammónium-L (+)-tartaráttal (IR-indukált represszált) egészítettük ki. A tenyésztést 37 °C-on végeztük. A kísérlethez a következő törzseket használtuk fel: *hxnR*⁺ (FGSC A26), *hxnRΔ* (HZS.136) és *hxnR*^{c7} (FGSC A872). B: A *hxnS* és *hxnP* gének expressziója nitrogénéhezés hatására. A micéliumokat 5 mM urea nitrogénforráson neveltük 8 órán keresztül, majd vagy további 2 óra hosszat inkubáltuk ugyanebben a tápoldatban (U-urea, tradicionálisan neutrális körülmény, amely a mi kísérleti rendszerünkben végül gátló körülménynek mutatkozott), vagy áthelyeztük őket nitrogénforrás nélküli (St-starvation, nitrogénéhezés), vagy 10 mM NA nitrogénforrást tartalmazó tápoldatba (I-indukáló körülmény). A qRT-PCR eredmények feldolgozását minden esetben a "standard curve" módszer alapján hajtottuk végre, amelyekben kontrollként az *acnA* (γ-aktin) mRNS szolgált. Az ábránkon a 3 párhuzamos mérésből adódó szórás értékeket feltüntettük. C: A *hxn* klaszter gének elrendeződése a VI. kromoszómán.

A *hxnS* és *hxnR*-en kívül további négy gén, a *hxnT*/AN9177, *hxnP*/AN11189, *hxnY*/AN11188 és *hxnZ*/AN11196 NA-val és 6-NA-val indukálható volt és a *hxnR* esszenciálisnak bizonyult a kifejeződésükhöz (15. ábra, A panel). A *hxnS* és *hxnZ* szomszédos génjei (AN9179 és AN9174) nem indukálhatóak NA-val és a kifejeződésüket nem befolyásolják a *hxnR* funkcióvesztést, illetve konstitutivitást okozó mutációi, mint ahogyan a klaszter génjei esetében ez megfigyelhető. Ezeket a géneket ezért már nem tekintjük a klaszter részének. A 15. ábrán (A panel) bemutatott qRT-PCR eredmények (Ámon és mtsai., 2017) alapján megállapítottuk, hogy a *hxnR* gén nem represszált körülmények között derepresszálódik és autoregulációt mutat, azaz inducer jelenlétében képes a saját génkifejeződését fokozni. A Scazzocchio csoport mRNS szint vizsgálatával kimutatta, hogy *hxnR2* pont mutánsban nincs kimutatható *hxnR* expresszió, ami alátámasztja, hogy a *hxnR* transzkripció szintjén egy autoregulációs folyamat játszódik le, ahogy azt az *alcR* gén esetében is leírták (Lockington és mtsai., 1987). Ezzel ellentétben a többi klaszter gén nem indukált körülmények között nem mutat génkifejeződést (15. ábra, A panel). Nitrogénéhezés mellett is vizsgáltuk a klasztergének kifejeződését (*hxnS* és *hxnP* gének reprezentálták a klasztergéneket) (15. ábra, B panel) és azt tapasztaltuk, hogy a klasztergének derepresszált állapotba kerülnek, de csak akkor, ha a *hxnR* funkcionális. Meglepetésünkre, a tradicionálisan neutrálisnak vélt, urea nitrogénforrás alkalmazása mellett a *hxnR^{c7}* törzsben a klasztergének nem fejeződnek ki (15. ábra, B panel). Ezt követően számos független kísérletben is az urea neutrális helyett, gátló nitrogénforrásként hatott, aminek az oka a vegyszer ammónium szennyezettsége lehet. Mint ahogyan azt a 16. ábra mutatja, az ammónium erős represszora az *hxn* gének kifejeződésének, beleértve a *hxnR*-t is indukált-represszált körülmény mellett (15. ábra, A panel, IR körülmény).

Mivel a klasztergének ilyen extrém érzékenységet mutatnak az ammónium jelenlétére, megvizsgáltuk a nitrogénforrás hasznosítási útvonalaknál gyakran előforduló ko-regulátor, az AreA NA katabolikus útvonal génjeire kifejtett hatását (Arst és Cove, 1973; Wilson és Arst, 1998; Scazzocchio, 2000). Az AreA ammónium hiányában indukálja a *hxnS* és *hxnP* expresszióját (16. ábra). Az *areA* null mutáns (*areA600*) törzsben a *hxnS* és *hxnP* gének expressziója minden körülmény, még nitrogénéhezés alatt is teljesen megszűnt, ami alapján az AreA esszenciális fehérjének bizonyult a *hxnS* és *hxnP* gének kifejeződéséhez, tehát pozitív koregulátora ezen gének expressziójának. Meglepő módon azonban, az *xprD1* mutánsban (extrém módon derepresszált *areA* allél, ami kis mennyiségű ammónium jelenlétében is ki tud fejeződni, ellentétben a vad típusú génnel) a vizsgált gének kifejeződése a várttal ellentétben teljesen gátlódott ammónium hatására. Ez az eredmény eltér attól, amit a

nitrát asszimiláció enzimeit kódoló gének esetén (Punt és mtsai., 1995; Platt és mtsai., 1996), a purin asszimiláció (Cultrone és mtsai., 2007), a glutamát-aszpartát transzporter gén, az *agtA* (Apostolaki és mtsai., 2009) és a *hxB* (Amrani és mtsai., 1999) esetén tapasztaltak, ahol az *xprD1* derepresszált mutánsban teljes génexpressziós szinteket mutattak ki. A *hxn* klasztergének esetén tapasztalt szokatlan hatás nem egyedülálló az irodalomban, ugyanis az *ureA* gén (a fő urea transzporter kódoló génje) esetében már leírtak hasonló jelenséget (Abreu és mtsai., 2010).

16. ábra: A *hxnP* és *hxnS* mRNS szintje *areA⁺* (FGSC A26) vad típusú, egy derepresszált *areA* mutáns (*xprD1*, HZS.216), és egy *areA* funkcióvesztéses mutáns (*areA600*, CS3095) törzsben

Nem indukáló körülmény (NI): a törzseket 5 mM ammónium-L(+)-tartarát nitrogénforráson 8 órán keresztül inkubáltuk, majd áthelyeztük őket 1 mM acetamid nitrogénforrás tartalmú tápoldatba további 2 óra inkubációra.

Indukáló körülmény (I): az ammónium D (+) tartarát tápoldaton történő 8 óra tenyésztést követően a micéliumokat áthelyeztük 10 mM NA nitrogénforrásra és további 2 órán át ráztuk. Indukáló-represszált körülmény (IR): az ammónium D (+) tartarát tápoldaton történő 8 óra tenyésztést követően a micéliumokat áthelyeztük 10 mM NA nitrogénforrásra, majd 5 mM ammónium-L (+)-tartarát adagoltunk hozzá, amit további 2 óra tenyésztés követett. Represszált körülmény (R): a törzseket 10 órán át 5 mM ammónium-L (+)-tartarát nitrogénforráson tenyésztettük. Nitrogénéhezés (St): 8 óra növekedés után az ammónium D (+) tartarátos tápoldatból a tenyészetet nitrogénforrás nélküli tápoldatba helyeztük és további 2 órán át inkubáltuk. A qRT-PCR mérések kiértékelését a "standard curve" módszer alkalmazásával végeztük el, a belső kontroll pedig a γ -actin (*acnA*) volt. Az ábrán a 3 párhuzamos mérésből adódó szórás értékek fel vannak tüntetve.

Annak kiderítésére, hogy vajon maga a NA indukál, vagy az útvonal valamelyik későbbi, downstream metabolitja valójában az igazi inducer, *hxB* mutánsokban (*hxB20* mutánsban teljesen hiányzik a HxnS (és HxA) aktivitás, de az expresszióra nincs hatással) (Sealy-Lewis és mtsai., 1979) vizsgáltuk a *hxnS* és *hxnP* gének kifejeződését. A 17. ábrán bemutatott *hxnS* és *hxnP* expressziója azt mutatja, hogy a *hxB20* mutánsban a NA nem

viselkedik inducerként (a *hxnS* és *hxnP* kifejeződés elmarad), de a 6-NA igen. A jelenség mögött az áll, hogy ebben a törzsben a HxnS nem aktív, így a NA 6-NA-vá alakítása nem történik meg, és a további downstream metabolitok sem jönnek létre. Ezek alapján az útvonal katabolit indukere vagy a 6-NA, vagy annak későbbi származéka. A 26. ábrán (6.7. alpont) látható *in vivo* teszt alapján, a 2,5-DP is inducerként hat, ami azt sugallja, hogy az utóbbi eset áll fenn.

17. ábra: A *hxnP* és *hxnS* gének NA és 6-NA-val történő indukálhatóságának vizsgálata *hxB20* mutánsban. A vizsgálatba bevont törzsek: *hxnR*⁺ *hxB*⁺ (FGSC A26: *hxnR* és *hxB* gén is vad típusú), *hxnR*⁺ *hxB20* (HZS.135: *hxnR* vad típusú, *hxB* génjében funkcióvesztést okozó mutáció), *hxnR*Δ *hxB*⁺ (HZS.136: deléciós *hxnR*, vad típusú *hxB*) és *hxnR*^{c7} *hxB*⁺ (FGSC A872: konstitutív *hxnR*, vad típusú *hxB*) törzsek. Az alkalmazott indukáló és nem indukáló körülmények megegyeztek a 15. ábránál leírtakkal. NA: indukció 1 mM nikotinsavval, 6-NA: indukció 1 mM 6-hidroxi-nikotinsavval. Az *hxB20* mutáció a HxnS aktivitását teljesen megszünteti, anélkül hogy az expresszióját befolyásolná (Sealy-Lewis és mtsai., 1979). A qRT-PCR mérések kiértékelését a "standard curve" módszer alkalmazásával végeztük el, a belső kontroll pedig a γ -actin (*acnA*) volt. Az ábrán a 3 párhuzamos mérésből adódó szóródási értékek fel vannak tüntetve.

6.5. A *hxn* gének NA hasznosításban betöltött szerepe

A HxnR és HxnS funkcióját már a 6.1 és 6.2 pontban részleteztük, ebben a részben pedig a többi klaszter gén által kódolt fehérje lehetséges szerepét tárgyaljuk.

Az adatbankban publikált, AN11198 lókuszhhoz rendelt génmodell vizsgálata során úgy véltük, hogy a HxnP fehérje szekvenciája hibásan van megjelölve. Az adott régiót lefedő cDNS szekvenálása során kimutattuk, hogy a negyedik intronon feltételezett splicing akceptor helye és ennek következtében az ötös exon szekvenciája is helytelen. A javított génmodell a 18. ábrán látható. A szekvencia elemzése során észleltük, hogy a negyedik intron kettévág egy

Met kodont, amely jelenség konzervált mind az Aspegillaceae mind pedig a Talaromyces nemzetségben, ami alátámasztja modellünk helyességét (Ámon, Fernandez-Martin és mtsai., 2017).

```

A.nidulans hxnP (locus AN11189)
ATGGGCGCCACTGCCACCGATATTGAGAAGGTTCCATCGGCCGGGACACCGGACGAGCCCAAGGCC
GGCGAGACTAATGTCTATGTTGACACCGAGGCGGAGAAGAGTTTCGgtatgttgatcgaacggctc
atgatcaatgagtcggaagggacgcgggaattgctgaccggtacagTCCGCAAGGTGGACTTCTT
TGTCCTGCCTATGCTATGTTTGgtatatattgccctgatccctgtggtagacaggcggcggtatagg
ctaaccgcggcagATGTACTTCTTTGACTGCATGGATCGAgtatgttcagcctccctctactcgct
tgaataaaaaaacaacggcacactaattttagactatagAGCAACCTCGCCAACGCCAAAACGGA
CGGCCTGGAAGAGGACATCAATCTCAAGGGCAACGAATACTCGCTCCTCATCCTGCTCTTCTATAT
CCCCTTTGGCCTGTTTGATCTGCCATGGAACCTGCTGATCAAGCGGTACTCGGCACGGATTATGCT
CTCGCTCAgttaggtctttcatccgcagtgggaaaccctaattgctgataggacggtacgagTGAC
CGTCGCTCGGGGTATCTGCGCGTTGTGTCAATGCGCAGCAAATAACTTCGGCGGATTACTCGCTAT
TCGCATTATCCTAGGgtatgtttcgcgcgcagagatcctgccaggatgtgactgacaaaaccgccc
gcaagAGTCTTTGAAGCAGGCTTCTTCGCCGGCTCGACCTTCTACTTCACGCTCTTCTACACCCGC
AATGAGATGGGGTTTCGGCTCGCGGTCTGCAGTCCTTCGCCGTGCTGGCGTCGGCATTACAGCGGC
TTGATCTCGTTTCGGCCTATTCCAGATAAACCATTCCGCCGTGAAGGGATGGCAGTGGCTCTTTATT
GTCGAGGGGGCCATGACGCTGATTATTGGAGTGATTGGGTTCTGGTGGTTACCGGACACAGCCCAG
AGCGCGTGGTTTCTCACGCAGCGAGAACGAGACGCGGCTTCTGCCAGGCTCCTGAGGGATACGTCT
GCAGAGATCGAGACAAACTGGAGCTGAAGGCTGCATTTCAAACATGGAGCGACTGGAAGTTTCCC
ATCTGGGCTGTTATCACCTTTTCTACCCGGTTGCGTATGCGACGGCGATGAACCTCTTTCCCATT
gtatgtccccgaaagctacattacccttttttttttttttttttttacattattatcaggttatttttact
gacgacgcagATCGTGGCTCGCCTCGGCTACTCCGTCGTCAAGACGAACCTCTGGACTGTAGCGCC
TAATCTCGTTGGCGCGGTGGTACTGCTCGTCGTCGTAAGTCATCTGATATCTTCCGCGAGCGGTC
CTTGACATATCATCTTTAGCCTGACGGTTTCACTGGTGGGAATGTTGATCCTGGCTAGTATTGATGT
CTCGCATAACAAGGGCGTCTCGTACTTCGCCTGCTTCTTACTCGCATCTGGTGCATACATTCCGAC
GTGTCTCGTGCACGCTGGCACAATAACAATAACACGAACGAGAACTCCCGCGCTGCTAACACTGG
CTTCTTTGTGGGCTGGGCAATATCGCTGGTGTCTGAGTGCCGCTACCTTCAGGACAGAGTATGC
GCCCAAGTATGTGCCACGCTGGTTGCGACGTGTGCGTGTAAACGGGGTCTGCATACTCGCTACCGC
CTTTATGGGCACTTGGATGAGGCTGGAGAACC GGCGCAAAGACAAGGAGCAGGGTGCTCGAATTGT
TGCCGGGCAGGTCGAGACGCGGATGCTGGCAGACGGCGAGAAGAGTCCAGAGTGGCGGTATTTTCT
GTAG

A.nidulans HxnP
MGATATDIEKVPSAGTPDEPKAGETNVYVDTEAEKSFVRKVDFVLPMLCLMYFFDCMDRSNLANA
KTDGLEEDINLKGNEYSLLILLFYIPFGLFDLPWNLLIKRYSARIMLSLTVVWGICALCQCAANN
FGGLLAIRIILGVFEAGFFAGSTFYFTLFYTRNEMGFRLAVLQSFVLAFAFSGGLISFGLFQINHS
AVKGWQWLFIVEGAMTLIIIGVIGFWWLPDTAQSAWFLTQRRERDAASARLLRDTSAEIETKLELKA
FQTWSDWKFPiWAVITFSYPVAYATAMNFFPIIIVARLGYSVVKTNLWTVAPNLVGAVVLLLVAKSS
DIFRERSLHIIIFSLTVSLVGMILILASIDVSHNKGVSFYACFLLASGAYIPTCLVHAWHNNNTNEN
SRAANTGFFVGLGNIAGVLSAATFRTEYAPKYVPTLVATCACNGVCILATAFMGTWMRLNRRKDK
EQGARIVAGQVETRMLADGEKSPEWRYFL

```

18. ábra: A hxnP gén modelljének javítása

Felül a kódoló régió exon-intron határait mutatjuk. Az intronok szűrkevel vannak kiemelve, a donor- lasszó- és akceptor szekvenciák kékkel. Alul a HxnP fehérje szekvenciája található. Lila szín a negyedik intron által kettévágott Met kodont jelöli.

Számítógépes analízis alapján (NCBI-Blastp) megállapítottuk, hogy a HxnP feltételezhetően az MFS, "Major facilitator superfamily" 12 szegmensből álló transzmembrán

(TM) proteinje. Legközelebbi, jellemzett homológja a TNA1, a *S. cerevisiae* (Llorente és Dujon 2000) NA transzportere, mellyel 23,5% azonosságot mutat. Érdekes módon a TNA1 legközelebbi homológja az *A. nidulans* genomban nem a HxnP, hanem az AN5650 (31,4% azonosság). Számos más paralóg is jelen van a genomban, amelyek nagyobb hasonlóságot mutatnak TNA1-el mint a HxnP, ami jelentheti a szubsztrátspecifitás eltérését, és/vagy a NA transzporterek redundanciáját. Az AN5650 nagyfokú hasonlósága a TNA1-el felvetette annak a lehetőségét, hogy az AN5650 is szerepet játszhat a NA hasznosításban, ezért megvizsgáltuk a gén expressziójának változását NA indukció hatására *hxnR*⁺ és *hxnRΔ* törzsekben (a reakciók templátjaiként a 15. ábra mRNS mintái szolgáltak). Míg a *hxnP* regulációs mintázata azonos volt a *hxnS*-nél és a többi klaszter génnél megfigyelvekkel, az AN5650 gén expressziója teljesen függetlennek bizonyult a *hxnR*-től és a NA indukciótól, ami ellene szól annak, hogy szerepe lenne a NA hasznosítási útvonalban (nem mutatott adat).

A HxnZ-t szintén az MFS1 szupercsalád 12 TM fehérjéjeként azonosítottuk, amelynek feladatát nem egyszerű megfejtetni. A legközelebbi jellemzett homológja *S. cerevisiae*-ben a PH084, egy magas affinitású foszfát transzporter. Mindkét fehérje hasonló a cukor transzporterekhez (Bun-Ya és mtsai., 1991), de a HxnZ nagy azonosságot mutat egy, a *Candida albicans* (29,57%) morfológiai váltásában résztvevő transzporterével és az emlős szerves anion és kation transzporterekkel. Ezen kívül kicsit kevesebb hasonlóság áll fenn a *Pseudomonas putida* 4-hidroxibenzoát transzporterével. Így a legvalószínűbb az, hogy a HxnZ a NA hasznosítási útvonalhoz kapcsolódó néhány aromás metabolitot transzportálhatja.

A *hxnT* gén egy flavin-oxidoreduktázt kódol (Oxidored_FMN, PF00724), amely nagyfokú hasonlóságot mutat lehetséges alkán reduktázokkal (33,7% a *C. albicans* Q5A0J5-tel, ami potenciálisan egy NADH-függő flavin-oxidoreduktáz; 43,3% az *Azorhizobium caulinodans* AZC_1066 morfin reduktázával, de csak 13% az *A. caulinodans* AZC_2798 6-NA reduktázával). Az I-Tasser program értékelése alapján a HxnT legközelebbi struktúrális analógja a 12-oxopfitodienoát-reduktáz-3 a paradicsomból (OPR) (Breithaupt és mtsai., 2006). Szerkezetét és OPR-rel való szerkezeti egyezését a 19. ábra mutatja be (A, B panel). Az analízis alapján a *hxnT*-nek NADH dehidrogenáz aktivitással kell rendelkeznie, amelyet enzimaktivitás festéssel igazoltunk is (19. ábra, C panel). A 19. ábra akrilamid géljén egy nagy mobilitású NADH dehidrogenáz sávot láthatunk, ami a *hxnR*^{c7} konstitutív mutánsokban jelen van, viszont a *hxnR*^{c7} *hxnTΔ* mutánsban nincs. Abban a *hxnR*⁺ törzsben, amelyet nem indukáló körülmények között neveltünk ez a sáv nem látható (19. ábra, C panel), abban viszont igen, amelynek nitrogénforrásként csak a 6-NA állt rendelkezésére. A 6-NA-n nevelt *hxnTΔ* törzsben ez a sáv szintén hiányzik (nem mutatott adatok).

19. ábra: A HxnT, egy FMN flavin-oxidoreduktáz

A: A *hxnT* modelljének (piros szalag) ráhelyezése a 12-oxopropionyl-CoA-reduktáz-3 szerkezetére (OPR, kék henger). A piros HxnT teljes átfedést mutatva körülöleli a kék OPR-t. Az FMN-t sárgával jelöltük. B: Az FMN kötéshely konzervációja a HxnT-ben. Az OPR kötéshelyeit Breihaupt munkája alapján rajzoltuk (Breithaupt és mtsai., 2006), amelyek kék színűek, míg a HxnT kötéshelyei pirosak. C: A HxnT enzim aktivitás festése (elektron donor a NADH) poliakrilamid gélen. Vad típusú (HXS.145), *hxnR^{c7}* (FGSCA872), *hxnR^{c7} hxnTΔ* (HXS.427), *hxnR^{c7} hxnYΔ* (HXS.429), *hxnRΔ* (HXS.136), *hxAΔ* (HXS.245) és *hxnSΔ* (HXS.254) törzseket 1 mM acetamid nitrogénforráson neveltük, 20 órán keresztül (NI: nem indukzív körülmény), vagy 1 mM NA, 1 mM 6-NA vagy 0,6 mM húgysav indukálószerrel adtuk a tápoldathoz 15 óra növekedés után (I-indukált körülmény). Az 5.26. ponttól eltérően a legalsó gélrészlet elválasztása 8-10% gradiens poliakrilamid gélen történt. A hipoxantin (HxA-t és HxnS-t is festi) és NA (csak HxnS-t festi) szubsztátokkal a festést a 10. ábrához hasonlóan végeztük. NI: nem indukált, I-NA: NA-val indukált, I-UA: húgysavval indukált (ami HxA-t indukálja, de a HxnS-t nem), I-6NA: 6-NA-val indukált tenyésztési körülményekre utalnak. Zöld nyíl: HxnS, piros nyíl: HxA, kék nyíl: HxnT.

Az NCBI-Blastp alapján a HxnY egy α -ketoglutarát függő dioxigenáz, ami a *Neurospora crassa* nagyon jól jellemzett timin-7-hidroxilázával 26% (T-7-H (Li és mtsai., 2015), az *A. nidulans* egy oxidoreduktáz aktivitással rendelkező fehérjéjével (AN0051) 25% hasonlóságot, az *A. nidulans* XanA (alternatív xantin oxidáz) és a *Pseudomonas putida* 2,5-DP dioxigenázával (KT2440, NicX) pedig 12% hasonlóságot mutat (20. ábra, A, B, C). (A NicX egy újszerű heterodox dioxigenáz (Jimenez és mtsai., 2008), ami a nikotinsav katabolizmus során a piridin gyűrű felnyitását katalizálja *P. putida*-ban.)

20. ábra: A HxnY egy aromás (heterociklusos) szubsztráton ható α -ketoglutarát-dioxigenáz

A: A HxnY AS szekvenciájának összehasonlítása a *N. crassa*-ból származó T-7-H-val (Li és mtsai., 2015), *A. nidulans* (AN0051) ortológjával és a *P. putida* 2,5-DP hidroxilázával, a NicX-szel (Q88FY1) (Jimenez és mtsai., 2008). Az összehasonlítást Mafft G-INS-i szoftverrel végeztük, a vizualizációt pedig a Box shade programmal.

Világoszöld csillag: Fe^{++} kötés. Fekete csillag: Fe^{++} kötés NicX-ben. Piros csillag: az α -ketoglutarát poláros kölcsönhatásai. Narancssárga csillag: az α -ketoglutarát hidrofób kölcsönhatásai. Sötétzöld csillag: timin direkt kapcsolatai. Kék csillag: timin víz-mediált kapcsolatai. B: A *N. crassa* T-7-H (kék henger) szerkezetére helyezett HxnY (piros szalag) modell. Barna: fém ion; halványzöld: α -ketoglutarát molekula; T-H-7 kék, piros: HxnY. C: A T-7-H C-terminálisán a Fe(II) -vel komplexet alkotó AS-ak (maga a fém ion barna). Az α -ketoglutaráttal kötött poláros kölcsönhatások pirossal, míg a timin direkt kölcsönhatásai zöldek. Ezekre ráhelyezve látható a HxnY modell, amelyet piros CPK formában mutatunk. Az érthetőség érdekében a HxnY AS-ak nincsenek megjelölve, azonban ezek az A panelről könnyen leolvashatóak. Kiemelendő a Tyr217 (Phe208 a HxnY-ban) és Phe292 (Phe279 a HxnY-ban) AS-ak konzerváltsága. Ezek közreveszik a piridin gyűrűt a T-7-H-ban és így valószínűleg

a NA származék piridin gyűrűjével is hasonló módon lépnek interakcióba a HxnY-ban. A HxnY modellt az I-Tasser hozta létre (C-score 0.16, becült TM-score 0.73 ± 0.11 , becült PMDS 6.2 ± 3.8 Å). A modellt VMD-vel vizualizáltuk, a két szerkezet egymásra vetítését pedig a VMD Multiseq facility segítségével végeztük el.

A HxnY a T-7-H Fe^{++} és α -ketoglutarát kötő helyeivel erős konzervációt mutat. Néhány aromás AS, amely komplexet képez a pirimidin gyűrűvel hidrofób kölcsönhatás révén (Tyr217, Phe292 a T-7-H-ban, ami megfelel a Phe209 és Phe279-nek a HxnY-ban) szintén konzervált, míg számos víz-mediált kölcsönhatást létrehozó AS nem (20. ábra). Ezek alapján nagyon valószínű, hogy a HxnY szubsztrátja egy zárt pirimidin gyűrűvel rendelkező NA származék.

6.6. A *hxn* gének deléciója Double-Joint PCR módszerrel létrehozott szubsztitúciós kazetta *A. nidulans*-ba transzformálásával

Annak érdekében, hogy a *hxn* gének NA lebontási útvonalban betöltött szerepét növekedési tesztekkel tovább tudjuk vizsgálni, minden *hxn* génre létrehoztunk deléciós törzseket.

6.6.1. A *hxnZ* gén deléciója

A *riboB*⁺ szubsztitúciós kazettát a TNO2 A21 törzsbe transzformáltuk és a transzformánsok közül PCR-rel azonosítottuk a vélhetően deléciós *hxnZ* törzseket. Southern hibridizációval igazoltuk, hogy a 9 jelölt közül 7-ben történt egykópiás integráció a *hxnZ* lókuszban (21. ábra).

21. ábra: A *hxnZ* deléció bizonyítása Southern hibridizációval

A: Vad típusú *hxnZ* genomi régió sémája. B: A kép alján látható, Double Joint PCR eljárással létrehozott szubsztitúciós kazetta beépülése esetén létrejövő, szelekciós markerrel kicserélt genomi régió sematikus képe. HR1 és HR2 a genomi régiókkal homológ, rekombinációt szolgáló szekvenciareszek. A cikk-cakos vonalak a BamHI hasítóhelyeket, míg a kettős végű nyilak a BamHI emésztésből származó termékek méretét jelölik. Hibridizációs próbának a "hxnZ upst frw"–"hxnZ upst rev" primer párokkal sokszorozott *hxnZ* upstream terméket jelöltük, amely az ábrán "Jelölt próba" néven látható. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek. C: a Southern-hibridizációs membránt mutatja be a szülői kontroll (H2S.120) és a vizsgált transzformáns törzsek (trf1- trf9) hibridizációs jeleivel. A nyílfejek a kazettát a megfelelő genomi régióban, egy kópiában hordozó törzseket jelölik.

A deléciós törzsek nikotinamidon csökkent növekedést mutattak (6.7. pont, 26. ábra). Egy *hxnZΔ* törzset kiválasztottunk a további kísérletek számára (HZS.226) és a HZS.399 és CS2638 törzsekkel kereszteztük. Az utódanalízis eredményeként megállapítottuk, hogy a mutáns fenotípus mindig a *riboB*⁺ alléllal szegregálódik.

6.6.2. A *hxnY* gén deléciója

A 6396 bp hosszúságú szubsztitúciós kazettát a HZS.120 törzsbe transzformáltuk és 20 riboflavin prototróf törzset izoláltunk. A PCR elő-szelekció során 7 deléciósnak vélhető transzformáns törzset választottunk ki Southern blot analízishez, ami során megállapítottuk, hogy a 7 vizsgált transzformánsból 3 hordozta a deléciót a kazetta további ektopikus integrációja nélkül (22. ábra). A deléciós *hxnY* törzsek növekedési képességét különböző nitrogénforrást, illetve indukálószeret tartalmazó táptalajon teszteltük és csak a 6-NA nitrogénforrás hasznosításban láttunk enyhe redukción (6.7. pont, 26. ábra). Az egyik *hxnYΔ* törzset (HZS. 223) kiválasztottuk a további kísérletek számára, és kereszteztük a HZS.395 törzzsel. A keresztezés utódanalízisekor a 6-NA-n történő enyhe növekedés csökkenést mindig csak a *riboB*⁺ utódokban láttuk. A fenotípus ko-szegregációja a szelekciós markerrel arra utalt, hogy a fenotípus a *hxnY* deléciójához köthető.

22. ábra: A *hxnY* deléció bizonyítása Southern hibridizációval

A: Vad típusú *hxnY* genomi régió sémája. B: A kép alján látható, Double Joint PCR eljárással létrehozott szubsztitúciós kazetta beépülése esetén létrejövő, szelekciós markerrel kicserélt genomi régió sematikus képe. HR1 és HR2 a genomi régiókkal homológ, rekombinációt szolgáló szekvenciareszek. A cikk-cakkos vonalak a BamHI hasítóhelyeket, míg a kettős végű nyílak a BamHI emésztésből származó termékek méretét jelölik. Hibridizációs próbának a "hxnY upst frw"–"hxnY upst rev" primer párokkal sokszorozott *hxnY* upstream terméket jelöltük, amely az ábrán "Jelölt próba" néven látható. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek. C: a Southern-hibridizációs membránt mutatja be a szülői kontroll (HZS.120) és a vizsgált transzformáns törzsek (trf1- trf7) hibridizációs jeleivel.

A nyílfejek a kazettát a megfelelő genomi régióban, egy kópiában hordozó törzseket jelölik.

6.6.3. A *hxnT* gén deléciója

A *hxnT* gén kiütéséhez *pabaA*⁺ gént tartalmazó szubsztitúciós kazettát alkalmaztunk. A kazettát HZS.120 törzsbe transzformáltuk és 20 para-amino-benzoészav prototróf telepből 8 potenciális deléciós transzformánst választottunk ki PCR előszelekcióval, amelyeken Southern analízist hajtottunk végre. A kísérlet eredményeként a 7 lehetséges *hxnTΔ* transzformáns közül csak 1-ben történt meg a *pabaA*⁺ egykópiás beékelődése a *hxnT* lókuszbba (HZS.222) homológ rekombinációval (23. ábra). A deléciós *hxnTΔ* törzs a diagnosztikai, allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalajon NA és 6-NA inducer alkalmazása mellett is csökkent növekedést mutatott (6.7. pont, 26. ábra). A *hxnTΔ* törzs HZS.397-tel történő keresztezésekor az utódanalízis során a deléciós fenotípus *pabaA*⁺ allélel történő koeszegregációját láttuk, amely bizonyítja, hogy a fenotípus a *hxnT* deléciójához köthető.

23. ábra: A *hxnT* deléció bizonyítása Southern hibridizációval

A: Vad típusú *hxnT* genomi régió sémája. B: A kép alján látható, Double Joint PCR eljárással létrehozott szubsztitúciós kazetta beépülése esetén létrejövő, szelekciós markerrel kicserélt genomi régió sematikus képe. HR1 és HR2 a genomi régiókkal homológ, rekombinációt szolgáló szekvenciareszek. A cikk-cakkos vonalak az EcoRI hasítóhelyeket, míg a kettős végű nyílak az EcoRI emésztésből származó termékek méretét jelölik. Hibridizációs próbának a "hxnT down frw"- "hxnT down rev" primer párokkal sokszorozott *hxnT* downstream terméket jelöltük, amely az ábrán "Jelölt próba" néven látható. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek. C: a Southern-hibridizációs membránt mutatja be a szülői kontroll (HZS.120) és a vizsgált transzformáns törzsek (trf1- trf7) hibridizációs jeleivel.

A nyílfejek a kazettát a megfelelő genomi régióban, egy kópiában hordozó törzseket jelölik.

6.6.4. A *hxnP* gén deléciója

Az 5.27.3.4. pontban részletezett módon létrehozott szubsztitúciós kazetta transzformációját követően, PCR előszelekció során válogattuk ki a vélhetőleg *hxnP* deléciós

törzseket. Ezután Southern blot analízist is készítettünk, amelynek eredményeként a 11 tesztelt transzformáns közül 7-ben találtunk egykópiás integrációt a *hxnP* lokuszban.

24. ábra: A *hxnP* delécia bizonyítása Southern hibridizációval

A: Vad típusú *hxnP* genomi régió sémája. B: A kép alján látható, Double Joint PCR eljárással létrehozott szubsztitúciós kazetta beépülése esetén létrejövő, szelekciós markerrel kicserélt genomi régió sematikus képe. HR1 és HR2 a genomi régiókkal homológ, rekombinációt szolgáló szekvenciárészek. A cikk-cakkos vonalak az EcoRI hasítóhelyeket, míg a kettős végű nyílak az EcoRI emésztésből származó termékek méretét jelölik. Hibridizációs próbának az "hxnP upst frw"- "hxnP upst rev" primer párokkal sokszorozott *hxnP* upstream terméket jelöltük, amely az ábrán "Jelölt próba" néven látható. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek. C: A Southern-hibridizációs membránt mutatja be a szülői kontroll (TNO2 A21) és a vizsgált transzformáns törzsek (trf1- trf11) hibridizációs jeleivel. A nyílfejek a kazettát a megfelelő genomi régióban, egy kópiában hordozó törzseket jelölik.

Ezek közül 3 törzs nem volt képes NA-n és 6-NA-n nőni (a fenotípus megegyezik a *hxnR* funkcióvesztéses mutánsal). A genomba rekombinálódott transzformáló kazetta szekvenálásával kimutattuk, hogy az alkalmazott *hxnP* downstream régió a 3, NA-t nem hasznosító törzsben nukleotid eltérést mutat a vad típusú megfelelőjéhez képest és a mutáció a *hxnR* (a klaszter transzkripció faktor) gén kódoló szekvenciáját érinti missense változást okozva (*hxnR80* mutáns, 2. táblázat). Úgy véljük, hogy amikor a szubsztitúciós kazetta elemeit felszaporítottuk és azokat összeszereltük, a polimeráz hibát ejtett a rendkívül GC gazdag *hxnR* kódoló régió sokszorozásakor, amit a transzformálás során bevittünk a recipiens törzsbe. Így a NA-t és 6-NA-t nem-hasznosító transzformánsok hordozzák a *hxnP* delécióján kívül a *hxnR80* mutációt is (H.ZS.220 törzs, 2. táblázat), amelyek pedig tudnak nőni NA és 6-NA nitrogénforráson, csak a *hxnP* delécióját hordozzák (H.ZS.221) (24. ábra). A *hxnPΔ* törzs csökkent mértékben hasznosítja a 6-NA-t a *hxnP*⁺ kontrollhoz képest, és a 6-NA inducerként történő alkalmazásakor a törzs erősen redukált növekedést mutat allopurinollal kiegészített

hipoxantin táptalajon (*hxnS* aktiválódását és működését tesztelő diagnosztikai értékű táptalaj). Azt, hogy a deletált gén eredményezte a deléciós fenotípust, a transzformánsok HZS.399 és CS2638 törzsekkel történő keresztezését követő részletes utódanalízissel igazoltuk. Az utódokban a deléciós fenotípus és a *riboB*⁺ marker gén ko-szegregációt mutatott, ami megerősítette, hogy a *hxnP* hiánya okozza a deléciós fenotípust.

6.6.5. A *hxnR* gén deléciója

A 5.27.3.5. pontban amplifikált 7611 bp hosszú fúziós terméket a TNO2 A21 törzsbe transzformáltuk, és a riboflavin prototróf transzformánsok növekedési képességét allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalajon teszteltük 1 mM NA inducer jelenlétében. 10 db *hxnR*Δ fenotípust mutató törzsön, melyek nem tudnak nőni a diagnosztikai táptalajon, Southern analízist hajtottunk végre. Southern hibridizációval 9 törzsben igazoltunk 1 kópiás integrációt a *hxnR* lókuszban (25. ábra). A fenotípus delécióhoz való köthetőségét rekonstitúciós törzs létrehozásával igazoltuk. A *hxnR*⁺ allélt egy kópiában a deléciós törzs genomjába juttatva minden teszt táptalajon (diagnosztikai hipoxantin, NA és 6-NA táptalajon) a növekedési képesség teljes helyreállítását tapasztaltuk (6.8.2. alpont, 37. ábra).

25. ábra: A *hxnR* deléció bizonyítása Southern hibridizációval

A: Vad típusú *hxnR* genomi régió sémája. B: A kép alján látható, Double Joint PCR eljárással létrehozott szubsztitúciós kazetta beépülése esetén létrejövő, szelekciós markerrel kicserélt genomi régió sematikus képe. HR1 és HR2 a genomi régiókkal homológ, rekombinációt szolgáló szekvenciaregionok. A cikk-cakos vonalak az *Xba*I hasítóhelyeket, míg a kettős végű nyílak az *Xba*I-emésztésből származó termékek méretét jelölik. Hibridizációs próbának a "hxnR prom frw" és "hxnR prom rev" primer párokkal sokszorozott terméket jelöltük a *hxnR* upstream régióból, amely az ábrán "Jelölt próba" néven látható. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek. C: a Southern-hibridizációs membránt mutatja be a szülői kontroll (TNO2 A21) és a vizsgált transzformáns törzsek (trf1- trf10) hibridizációs jeleivel.

A nyílfejek a kazettát egy kópiában, a megfelelő genomi régióban hordozó törzseket jelölik.

6.7. A deléció törzsek növekedési képességének vizsgálata különböző N-forrásokon

A *hxn* gének NA hasznosításban betöltött szerepét a deléció törzseken végzett növekedési tesztekkel is vizsgáltuk. Hipoxantin nitrogénforrás hasznosítás csak a HxnS aktivitásán keresztül történhet meg, amennyiben a HxA-t allopurinollal gátoljuk. Normál körülmények között ez NA vagy NA származék (pl. 6-NA, 2,5-DP, NAA) metabolit általi indukciót igényel, de konstitutív *hxnR^c* törzsben indukció nélkül is aktiválva vannak a *hxn* gének. Az allopurinollal kiegészített hipoxantin táptalaj indukerek jelenlétében diagnosztikai értékű a *hxn* klaszter aktiválódásának tesztelésére, valamint a HxnS működésének vizsgálatára. Ráadásul, ez az aktivitás vizsgálathoz sokkal érzékenyebb teszt a NA és származékainak nitrogénforrásként történő felhasználásához képest, mert a hipoxantin nitrogénforrásként való hasznosítása sokkal jobb a nikotinsavénál, sokkal jobban láthatóak és kategorizálhatóak a mutáns fenotípusok. A többi tesztben egyedüli nitrogénforrásként adtuk a NA-t, 6-NA-t, 2,5-DP-t vagy a NAA-t 10 mM koncentrációban.

A *hxnP* deléciója csak igen kis mértékben érinti a NA nitrogénforrásként való hasznosíthatóságát, de egyértelműen hat a 6-NA és NAA felhasználásra (26. ábra). A két metabolit felvételét a diagnosztikai értékű hipoxantin táptalajon nézve nyilvánvaló, hogy a feltételezett transzporter funkciójú HxnP szerepet játszik a 6-NA felvételében.

A *hxnZ* deléciója nem okozott látható eltérést a növekedésben a vad típushoz képest sem NA sem 6-NA táptalajokon, azonban NAA nitrogénforráson csökkent növekedést látunk (26. ábra). A NAA NA-vá alakulhat a nikotinamid-deamináz révén (Ghislain és mtsi, 2002), amely enzim *A. nidulans*-ban (AN3809, II. kromoszóma) is megtalálható. Mivel a *hxnSΔ*, *hxnRΔ* törzsekben bár csökkent a NAA hasznosítás képessége, teljesen nem szűnt meg (egy mol N a NA katabolizmustól függetlenül is keletkezhet deamináció útján), az arra utal, hogy a NAA deaminációja nem a NA katabolikus útvonal által regulált. Megvizsgáltuk, hogy az *A. nidulans*-ban található feltételezett nikotinamid-deamináz (AN3809) ko-regulációt mutat-e a *hxn* génekkel és nem bemutatott eredményünk alapján azt találtuk, hogy az AN3809 expresszióját nem a HxnR regulálja és kifejeződését nem indukálja a NA jelenléte. Eredményeinket azon RNS szekvenálási adatok is alátámasztották, miszerint az AN3809 olyan körülmények között is jól expresszálódik, amikor a *hxn* struktúrgének nem kimutathatóak (Sibthorp és mtsai., 2013).

A *hxnP* és *hxnZ* dupla mutánsok fenotípusa az alkalmazott táptalajokon megegyezik a *hxnP* mutánséval, kivéve a 6-NA indukált hipoxantin diagnosztikai táptalajt (26. ábra), ahol enyhe additivitás látható a 6-NA inducer mellett. Azt igazolandó, hogy az HxnP igen kis hatékonysággal, de szállítja a NA-t, növekedési kísérleteinkbe bevontuk a *nicB8* mutációt (a

nicB gén terméke a NA bioszintézisben vesz részt, hiányában NA auxotrófia lép fel). Keresztezéssel *nicB8 hxnP* dupla mutánsokat hoztunk létre, és NA-t kevesebb mint 1 μ M koncentrációban adva a táptalajhoz vizsgáltuk, hogy sérül-e a dupla mutánsokban a NA auxotrófia szupplementációja. Az *hxnP* delécioja nem volt hatással a *nicB8* auxotrófia szupplementációjára. Ez azt jelenti, hogy ha a *hxnP* és *hxnZ* kis mértékben érintettek is a NA felvételében, rajtuk kívül még más NA transzporter(ek) is szerepet játszanak. Ez összhangban van a NA transzporterek redundanciájáról alkotott hipotézissel, és azzal hogy a HxnP vélhetően a NA, a 6-NA és a NAA alacsony affinitású transzportere.

26. ábra: Mutáns törzseink különböző nitrogénforrás hasznosítása

Minden oszlop felett feltüntettük az összes vizsgált törzs releváns mutációit. Hx: 1mM hipoxantin nitrogénforrás. Hx, allp: 1mM hipoxantin nitrogénforrás 5,5 μ M allopurinollal kiegészítve, ami gátolja a PHI (HxA) működését (viszont a PHII-t /HxnS-t nem). Hx, Allp, 100 μ M NA: 1 mM hipoxantin nitrogénforrás kiegészítve 5,5 μ M allopurinollal és 100 μ M NA-val; Hx, Allp, 100 μ M 6-NA: 1 mM hipoxantin nitrogénforrás kiegészítve 5,5 μ M allopurinollal és 100 μ M 6-NA-val. Hx, allp, 100 μ M 2,5-DP: 1 mM hipoxantin nitrogénforrás kiegészítve 5,5 μ M allopurinollal és 100 μ M 2,5-DP-el, Hx, Allp, 100 μ M NAA: 1 mM hipoxantin nitrogénforrás kiegészítve 5,5 μ M allopurinollal és 100 μ M NAA-dal. 10 mM NA, 10 mM 6-NA, 10 mM 2-5 DP, 10 mM NAA: az egyedüli nitrogénforrás 10 mM NA, 6-NA, 2,5-DP vagy 10 mM NAA. A csészéket 3 napig 37° C-on tartottuk, kivéve a *-gal jelölt esetekben, ahol az inkubációs időt 4 napra növeltük. Kontroll törzsek: szülői kontroll 1 (HXS.120), szülői kontroll 2 (TNO2 A21): az összes *hxn* gén tekintetében vad típusúak. Mutáns törzsek: *hxnSΔ* (HXS.548), *hxB20* (HXS.135), *hxnRΔ* (HXS.136), *hxnR80* (HXS.220), *hxnRc7* (FGSC A872), *hxnTΔ* (HXS.222), *hxnYΔ* (HXS.223), *hxnTΔhxnYΔ* (HXS.502), *hxnPΔ* (HXS.221), *hxnZΔ* (HXS.226), *hxnPΔ-hxnZΔ* (HXS.480), *hxnSΔ-hxnTΔ* (HXS.568), *hxnSΔ-hxnTΔ-hxnYΔ* (HXS.570). Utóbbi 3 törzset laborunkban Bokor Eszter hozta létre keresztezéssel, illetve a szomszédos gének egy lépésben történő deletálásával. A felhasznált törzsek teljes genotípusa megtalálható az 1. mellékletben.

A *hxnT* és *hxnY* gének deléciója nem befolyásolja egyértelműen a NA és 2,5-DP hasznosítását (a *hxnT* kevésbé, a *hxnY* sokkal erősebben), a 6-NA-ét viszont igen (26. ábra). Dupla deléciós mutánsokat hoztunk létre azon gének deletálásával, melyek hatással vannak a 6-NA hasznosítására (*hxnSΔ*, *hxnTΔ*, *hxnYΔ*), minden lehetséges kombinációban. A *hxnYΔ*-*hxnTΔ* dupla deléciós törzs a *hxnT* deléciós törzshöz hasonlít (26. ábra). A *hxnSΔ*-*hxnYΔ* dupla deléciós törzs (Bokor Eszter hozta létre) enyhe additív növekedés csökkenést mutatott 6-NA táptalajon (nem mutatott adat), míg a *hxnSΔ*-*hxnTΔ* dupla mutáns jobban nőtt a szülői kontrollnál (*hxnS*⁺, *hxnT*⁺, TNO2A21), a *hxnSΔ*-*hxnTΔ*-*hxnYΔ* tripla deléciós törzs pedig *hxnSΔ*-*hxnTΔ* dupla mutánsként viselkedett. A *hxnSΔ*-*hxnTΔ* és *hxnSΔ*-*hxnTΔ*-*hxnYΔ* mutánsokban mutatkozó paradox hatásnak az lehet a magyarázata, hogy a *hxnSΔ*-*hxnTΔ* törzsben felhalmozódott köztestermék egy eddig még nem azonosított, 4. gént indukál, ami szintén képes a 6-NA metabolizálására.

Az a tény, hogy egyik gén deléciója sem okozta a 6-NA (nitrogénforrásként) hasznosítás képességének teljes elvesztését (összehasonlítva a *hxnR* deléciójának hatásával), megerősíti azt az elképzelést, hogy a 6-NA metabolizmusa több útvonalon keresztül zajlik.

Különböző baktériumokban három különböző 6-NA hasznosítási útvonalat írtak le (Andreesen és Fetzner, 2002), ahogyan azt a bevezetőben is részleteztük. A *P. putida* aerob degradációja során, miután a NA-t egy nikotinsav-hidroxiláz 6-NA-vá hidroxilálja, a 6-NA oxidatív dekarboxilációjának eredményeként 2,5-DP (Andreesen és Fetzner, 2002; Jimenez és mtsai., 2008) jön létre. Ezt az anyagcsereterméket a vad típusú *A. nidulans* is fel tudja használni nitrogénforrásként, amely képességét egyik általunk vizsgált gén deléciója során sem vesztette el (kivéve a *hxnR* gén hiányát). Ráadásul, a diagnosztikai tesztekben a *hxnTΔ* *hxnYΔ* dupla mutáns esetén ez szolgál a HxnS inducereként is (26. ábra). Ez azt jelenti, hogy a 2,5-DP a NA hasznosítási útvonal közterméke, amelynek további metabolizmusa olyan, ezen a klaszteren kívül található géntől/génektől függ, ami/amik szintén a *hxnR* szabályozása alatt áll/állnak, valamint hogy a *hxnT*-nek és a *hxnY*-nak a 2,5-DP-től upstream kell működni.

6.8. A HxnR intracelluláris lokalizációjának vizsgálata *hxnR-gfp* fúziós konstrukciók kifejeztetésével és vizsgálatával

A NA lebontási útvonal regulátorának (HxnR) sejten belüli lokalizációja nem-indukált, indukált és indukált-represszált körülmények között új információt nyújthat a fehérje működéséről, kiegészítve ezzel eddigi funkcióvizsgálattal kapcsolatos eredményeinket. Mivel a HxnR szekvenciájában korábban NLS és NES szignált is azonosítottunk, arra számítottunk,

hogy vizsgálataink során a fehérje sejtmag és a citoplazma közötti ingázását figyelhetjük meg indukció, illetve represszió hatására.

6.8.1. C-terminális *hxnR-gfp* konstrukciók vizsgálata

6.8.1.1. Natív *hxnR*, *gpd* és *prnD* promóter által szabályozott konstrukciók kifejeztetése

A GFP fúziós konstrukciók építéséhez a pAN-HZS-1 és pAN-HZS-5 vektorokat alkalmaztuk (8. ábra), amelyek eredete a Punt és mtsai. által készített pAN-GFP expressziós vektor (Punt és mtsai., 1987). A pAN-HZS-1 a konstitutív *gpdA*, míg a pAN-HZS-5 a prolinnal indukálható *prnD* promóter után GFP-t kódoló szekvenciát és a *trpC* gén terminációs szekvenciáját tartalmazza. Mindkét vektorban az *A. nidulans* vad típusú *pantoB*⁺ génje szolgáltatja a szelekciót. A *gfp* ORF 5' végén NcoI klónozó hely található (Punt és mtsai., 1987). Mivel a *hxnR* szekvenciában is van egy NcoI felismerő motívum (az 1658. nt pozícióban), ezért ahhoz, hogy a *hxnR* gént beklónozhassuk a pAN-HZS1 és pAN-HZS-5 vektorba, előbb a *hxnR*-ben található NcoI hasító helyet el kellett rontanunk úgy, hogy az ne okozzon AS változást a transzlálódó HxnR-ben. Az NcoI hely elrontását Double-Joint PCR-rel (Yu és mtsai., 2004) végeztük el a *hxnR* két darabban történő amplifikációjával, ahol az "A" komponens reverz primere és a B komponens forward primere hordozza a mutációt. Az "A" és "B" komponenseket ezt követően egy "A" komponens specifikus nested forward és egy "B" komponens specifikus nested reverz primer segítségével szereltük össze (5.29.1. pont). A pAN-HZS-1-be klónozott *hxnR* a konstitutív *gpdA* promóterről fejeződik ki (8. ábra, B panel; 27. ábra, A panel). A pAN-HZS-5 vektorba kétféle *hxnR* hordozó szekvenciát juttattunk be. Az egyik az "A" komponensen hordozza a *hxnR* promóter régióját, így nem a *prnD* promóter, hanem a *hxnR* saját (natív) promóterének irányítása alatt áll a *hxnR* kifejeződése (27. ábra, A panel, pAN-HZS-8 vektor). A másik esetben a pAN-HZS-5 vektorba a *prnD* promóter és a *gfp* gén közé csak a *hxnR* kódoló régiót klónoztuk be, amelynek kifejeződését a prolinnal indukálható *prnD* promóter irányítja (5.29.1. pont, 8. ábra, pAN-HZS-6).

27. ábra: A *hxnR* promóter és a konstitutív *gpdA* promóter által meghajtott *hxnR-gfp* konstrukciók vizsgálata

A: A natív és *gpdA* promóteres konstrukciók sematikus ábrázolása. NcoI: a *hxnR* szekvencia klónozására használt hasítóhely helyzetét jelöli; B: A vizsgált transzformánsok *hxnR* kópiaszámát ábrázolja; *hxnR*⁺ (H.ZS.145): vad típusú kontroll; *gpd12* és *gpd19* (A.J.1 és A.J.2): a pAN-HZS-7-es konstrukciót hordozó transzformánsok; *gpdK8*: pAN-HZS-5 kontroll vektort tartalmazó transzformáns; up1, 2, 3, 16, 32 és 49 (H.ZS.511-516): a pAN-HZS-8-as vektor transzformánsai. C: Az előbbi transzformánsok komplementációs képességének ellenőrzése, a recipiens *hxnRA* törzzsel (H.ZS.416) kiegészítve. A tesztet hipoxantin táptalajon végeztük, ami 5,5 μ M allopurinol és 1 mM 6-NA kiegészítést tartalmazott.

A transzformánsok PHII enzimaktivitását is vizsgáltuk, poliakrilamid gélen. A törzseket 20 óráig acetamidon, 15 óráig acetamidon + 5 órán keresztül 1 mM 6-NA-val indukálva; 20 óráig prolin tápoldatban; vagy 15 óráig prolin tápoldatban + 5 óráig 1 mM 6-NA-val indukálva növesztettük. A HxnS jelenlétét egyik esetben sem tudtuk kimutatni (nem mutatott adat), valószínűleg az enzim alacsony koncentrációja miatt. Ez utóbbi összhangban áll azzal, hogy a hipoxantin diagnosztikai értékű táptalajon a *hxnR*⁺ kontrollhoz képest erősen redukált volt a többkópiás transzformánsok közül a legjobbnak a növekedése is.

A *hxnRA* komplementációjának majdnem teljes hiánya nem teszi lehetővé, hogy a *hxnR-gfp*-t kifejező törzsek mikroszkópos vizsgálatával bármilyen intracelluláris lokalizációra történő megállapítást bizonyítónak tekintsünk. Ennek ellenére megvizsgáltuk a HxnR-GFP kifejeződését fluoreszcens mikroszkópban is, nem-indukáló (acetamid), indukáló (acetamid 1

mM 6-NA-val kiegészítve) és indukáló-represszáló (acetamid 1 mM 6-NA-val és + 5 mM ammónium L (+)-tartaráttal kiegészítve) körülmények között (5.30. pont). A vizsgálatok során egyik natív promóteres transzformáns esetében sem detektáltunk fluoreszcens jelet, még a 24 kópiás törzsben sem. A *gpdA* promóteres transzformánsok közül a 4 kópiás transzformáns acetamid N-forráson nevelve élesen kivehető zöld fluoreszcens jelet mutatott a sejtmagban, de az is előfordult, hogy a HhoA-mRFP jelhez közel, de attól elkülönülten jelent meg (feltételezett sejtmagi „inclusion body”, nem feltüntetett adat). 2 óra NA indukció, vagy NA indukció és ammónium represszió együttes hatására is ugyanezt a sejtmagi jelenléte tapasztaltuk. A GFP önmagában, a HxnR fúzió nélkül, egyenletesen oszlott el a citoplazmában.

Mivel a prolinnal indukálható *prnD* promótert a szakirodalmi adatok szerint sikeresen alkalmazták már olyan transzkripció faktorok vizualizációjára, ahol a transzkripció faktor fiziológiás szintje túl alacsony volt (Galanopoulou és mtsai., 2014), a harmadik típusú konstrukciók indukálható promóterrel készültek az 5.29.1. pontban részletezett módon (28. ábra, A panel). Megvizsgáltuk a transzformánsok komplementációs képességét hipoxantin+prolin, és NA+prolin táptalajon, de azzal a problémával kerültünk szembe, hogy a táptalajba nagyon alacsony (1 mM, 100 μ M) mennyiségben inducerként adagolt prolin önmaga is nagyon jó nitrogénforrásként hatott, így növekedési tesztekben nem tudtunk információt nyerni a NA vagy 6-NA nem-hasznosítás komplementációjáról. Ezért a konstrukciót egy olyan törzsbe transzformáltuk, amely a prolint nitrogénforrásként nem képes hasznosítani (*prnD*⁻, HZS.543). A HZS.543 (*hxnRA::zeo*, *hhoA-mRFP-AfriboB*⁺, *prnD*⁻, *pantoB100*, *veA1*) törzset a *prnD*⁻ *pabaA1* *yA2* *veA1* (HZS.487) és *hxnRA::zeo* *hhoA-mRFP-AfriboB*⁺ *pantoB100* *veA1* (HZS.416) törzsek keresztezésével állítottuk elő. A transzformánsokkal mind a táptalaj teszt, mind pedig a mikroszkópozás lehetségessé vált. A növekedési tesztek során egy érdekes jelenségre figyeltünk fel. A *prnD*⁻ mutáns nem-represszáló nitrogén-forráson prolin kiegészítés mellett a mérgezés jeleit mutatta (28. ábra C és D panel). A 28. ábra D paneljében látható növekedési teszten megfigyelhető, hogy a *prnD*⁻ törzs (*hxnR*⁺ *prnD*⁻) jól hasznosítja mind a NA-t, mind pedig a 6-NA-t mint egyedüli nitrogénforrást. Azonban, ha akár rendkívül kis mennyiségben (0,5 mM inducer szintű mennyiség), vagy nitrogénforrás szintű mennyiségben (5 mM) adagolunk prolint a NA vagy 6-NA nitrogénforrás mellé, akkor NA nitrogénforrás mellett egy koncentráció függő fokozódó toxicitást észlelünk, 6-NA nitrogénforrás mellett pedig azonnali teljes növekedés gátlást látunk. A magyarázat arra, hogy miért különbözik a toxikusság a NA és 6-NA alkalmazott nitrogénforrások esetén az lehet, hogy a NA lassabban hasznosul, mint a 6-NA, a

NA→6-NA átalakítást végző HxnS enzim lassú kinetikája miatt. Összességében a prolin adagoláskor mutakozó mérgezés veszélybe sodorta a prolin indukálható *prnD* promóter alkalmazhatóságát a *hxnR-gfp* fúziós konstrukció kifejeztetésére. Azonban a későbbiekben kísérletes úton sikerült bizonyítani, hogy prolin adagolás nélkül is elérhető egy *prnD* genetikai háttérben a *prnD* promóter által a konstrukció indukciója, mégpedig a természetes prolin lebontó folyamat hiányában mutakozó állandó, legalább inducer mennyiségben jelen levő endogén prolin szint miatt, ami egy *prnD*⁺ háttérben soha nem alakul ki (Galanopoulou és mtsai., 2014).

28. ábra: A prolin indukálható *prnD* promóter által meghajtott *hxnR-gfp* konstrukciók vizsgálata *prnD*-prolin nitrogénforrást nem hasznosító mutánsban

A: A *prnD* promóteres konstrukciók sematikus ábrázolása. NcoI: a *hxnR* szekvencia klónozására használt hasítóhely helyzetét jelöli; B: A vizsgált transzformánsok *hxnR-gfp* kópiaszámát ábrázolja; 145 (HZS.145): *hxnR*⁺, *prnD*⁺ kontroll törzs; K1 és K2: pAN-HZS-5 vektort tartalmazó transzformánsok; 1, 10 (AJ.4), 24 (AJ.5), 30, 32 (AJ.3): a pAN-HZS-6-os konstrukciót hordozó transzformánsok; C: Az előbbi transzformánsok komplementációs képességének ellenőrzése. A tesztet a panel alján feltüntetett táptalajokon végeztük. D: Növekedési teszt, ahol bizonyítjuk, hogy a *prnD* mutánsban az inducer mennyiségben adagolt prolin toxikus hatású, valamint igazoljuk azt, hogy a táptalajhoz adagolt prolin nélkül is megtörik egy prolin általi indukció, amely az endogén úton keletkezett, a prolin lebontó folyamat hiányában indukció szempontjából elegendő mennyiségben jelen levő endogén prolin szintnek köszönhető.

A *hxnR-gfp* fúziót kifejező *hxnRA::zeo hhoA-mRFP-AfriboB⁺ prnD⁻* transzformánsok esetén 8 féle táptalajon teszteltük a *hxn* klaszter indukálhatóságát, a HxnS aktivitását (az allopurinollal kiegészített hipoxantin nitrogénforráson NA és 6-NA inducerek mellett), illetve a NA és 6-NA hasznosítás mértékét (10 mM NA és 10 mM 6-NA nitrogénforrásokon) prolin nélkül és prolin jelenlétében. Egyrészt újra bizonyítottuk azt, hogy a hozzáadott prolin mindegyik alkalmazott táptalajban toxikusan hat (28. ábra, D panel), másrészt megállapítottuk, hogy 6-NA nitrogénforráson bizonyos transzformánsok majdnem elérik a *hxnR⁺ prnD⁻* kontroll törzs növekedési képességét (28. ábra, C panel). A *hxnR* és *gfp* gének kópiaszámának vizsgálatával (28. ábra, B panel) kimutattuk, hogy a *hxnRA* mutáns fenotípus *hxnR-gfp* által történő komplementációja kópiaszám függő. Mivel a NA és a hipoxantin hasznosítás (amennyiben a HxA (PHI) gátlás a *hxn* klaszter indukciójával együttesen történik) egyedül a HxnS enzimtől függ, ezért az eddigi növekedési tesztek eredményeit úgy értékeljük, hogy a HxnR-Gfp nem tudja a *hxnS* gén transzkripcióját megfelelő mértékben aktiválni még magas kópiaszámban sem. Ezzel ellentétben a NA-tól downstream származék, a 6-NA hasznosításakor a hasznosításban résztvevő többi *hxn* gén magas *hxnR-gfp* kópiaszám esetén olyan mértékben nyilvánul meg, amely egy részleges komplementációhoz vezet ezen a nitrogénforráson. Ezen elképzeléseinket qRT-PCR vizsgálattal is alátámasztottuk (29. ábra).

29. ábra: *hxnR* promóterrel meghajtott, egykópiás *hxnR-gfp* fúziós transzformáns expressziós vizsgálata.

Nem induktív körülmények között a törzseket 10 órán keresztül acetamid nitrogénforráson (NI–nem induktív) növesztettük, induktív körülményként pedig a 8. órát követően még 2 órán át 1 mM 6-NA-val indukáltuk (I).

hxnR⁺: (H.ZS.145): vad típusú kontroll törzs; „natív prom.*hxnR-gfp*” (H.ZS.515): natív *hxnR* promóterrel meghajtott, egykópiás *hxnR-gfp* fúziós transzformáns. A qRT-PCR-t a standard curve módszer alapján értékeltük ki, amelyekben kontrollként a γ -aktin (*acnA*) mRNS szolgált. A génpróbák indítószekvenciái a 3. mellékletben találhatóak meg.

A továbbiakban kiválasztottuk a hipoxantin+allp.+1mM 6-NA táptalajon részleges komplementációt adó *trf/10* (4 kópiában hordozza a konstrukciót) és *trf/32* transzformánst (1 kópiában hordozza a konstrukciót) és megvizsgáltuk a fúziós fehérje intracelluláris lokalizációját indukáló, nem indukáló és indukáló-represszáló körülmények között (30. ábra).

30. ábra: A HxnR intracelluláris lokalizációjának vizsgálata a *prnD* promóter által meghajtott *hxnR-gfp* konstrukciót egy kópiában hordozó *prnD* recipiens törzsben

NI: nem indukáló körülmény: a tápoldat az inkubáció teljes ideje alatt acetamid nitrogénforrást tartalmazott. I: indukáló körülmény, acetamid szén-és nitrogénforrást tartalmazó tápoldathoz 1 mM 6-NA-t adagoltunk. IR: indukáló-represszáló körülmény, a tápoldatot 1 mM 6-NA-val és 5 mM ammónium-L (+)-tartaráttal egészítettük ki. Zöld: Gfp-vel fúzionált HxnR fehérje; piros: mRFP-vel fúzionált H1 hiszton. (Olympus FV1000 konfokális lézer szkennelő mikroszkóp, UPLSAPO 60x objektív, olaj, 1.35 N.A., 5x zoom, 488 nm és 543 nm lézer hullámhossz, 4 µs/pixel szkennelés), GFP és RFP filterek használatával (gerjesztési hullámhossz: 488 nm a GFP-hez, 543 nm az RFP-hez; kibocsátási hullámhossz: 510 nm a GFP-hez, 603 nm az RFP-he). „Z-stack”-elést kb. 5 µm nagy Z kiterjedésen végeztünk átlag 0.62 µm/réteg vastagságban. A 3D-s vizualizációt a Huygens Professional software 14.10.verziójával készítettük, amit előzetesen „dekonvolvált” képeken a „Surface Render”-el végeztük el, ahol az állítható küszöbértékeket úgy állítottuk be, hogy a „Surface-rendszer”-ben kapott kép átfedést mutasson a „MIP-renderer”-rel kapott képpel.)

A transzformánsokban 6-NA indukció nélkül is egyértelmű fluoreszcens jelet detektáltunk, amelynek lokalizációja a *gpdA* promóter által meghajtott konstrukció vizsgálatánál tapasztaltakkal megegyezett, azaz a sejtmagban lokalizálódott (30. ábra). A konfokális lézer szkennelő mikroszkóp alkalmazásával a 3D képalkotással készített képek alapján megállapítottuk, hogy a sejtmagon belül nem, vagy csak kis mértékben kaptunk átfedést a kromatint vizualizáló mRFP-kapcsolt H1 hisztonnal (HhoA-mRFP) nem-indukált és indukált-represszált körülmények között (30. ábra). Az indukált körülménynél magasabb fokú átfedést tapasztaltunk a kromatinnal. Összességében úgy értékeljük az eredményeinket, hogy a nem-induktív és indukált-represszált körülmények között tapasztalt sejtmagi jelenlét inkább a HxnR természetesnél nagyobb mennyiségben történő jelenléte miatt van, és nem feltétlen tükrözi a valós élettani helyzetet.

A natív és a *prnD* promóteres konstrukciókat egy kópiában hordozó transzformánsokban (utóbbi esetében mind *prnD*⁺ és *prnD*⁻ háttérben) megvizsgáltuk a *hxnR* kifejeződését qRT-PCR-rel, hogy a konstrukción levő promóterek indukálhatóságát az adott kísérleti rendszerben alátámasszuk (31. ábra).

31. ábra: Az egykópiás integránsok *hxnR* expressziója nem indukáló és indukáló körülmények között

A törzseket nem induktív körülmények között 10 órán keresztül acetamid nitrogénforráson (NI) növesztettük, induktív körülményként pedig a 8. órát követően még 2 órán át 1 mM 6-NA-val indukáltuk (I) vagy eleve 8 órán át 5 mM prolinban neveltük (PI). *hxnR*⁺ (HZS.145): vad típusú kontroll törzs; Natív: natív *hxnR* promóteres transzformáns (HZS.515), *prnD*⁻: *prnD* promóteres transzformáns (AJ.3), amit a prolin szénforrásként való hasznosítására képtelen, *prnD*⁻ recipiens törzsbe transzformáltunk (HZS.543); *prnD*⁺: *prnD* promóteres transzformáns (HZS.425), amit a *prnD* génre nézve vad típusú törzsbe juttatunk be (HZS.416). A qRT-PCR-t a standard curve módszer alapján értékeltük ki, amelyekben kontrollként a γ -aktin (*acnA*) mRNS szolgált. A génpróbák indítószekvenciái ("hxnR ReTi frw"- "hxnR ReTi rev" és "actin ReTi frw"- "actin ReTi rev") megtalálhatók a 3. mellékletben.

Vad típusú törzsben 6-NA indukció hatására megemelkedett a *hxnR* expressziós szintje, míg ez az indukció a natív promóteres, és a *prnD*⁺ háttérű, prolin indukálható transzformáns esetében nem történt meg. Ez utóbbi törzsben prolin hozzáadásakor indukálódott a *hxnR* kifejeződése, ami a prolin promóter tökéletes működését bizonyítja. A *prnD*⁻ törzsben a nem indukált mintában tapasztalt magas expresszió pedig alátámasztja a növekedési tesztek eredményei alapján feltételezetteket (28. ábra C és D panel), miszerint a prolin lebontására képtelen *prnD*⁻ mutánsban állandóan jelen van endogén eredetű prolin, amely elegendő ahhoz, hogy a *prnD* promóterről génkifejeződést indukáljon (a *prnA* transzkripció faktoron keresztül-Pokorska és mtsai., 2000). A natív promóteres törzs esetében a 6-NA általi indukció elmaradására magyarázatot a *hxnR* autoregulációja adhat, amelynek fennállását a korábbi transzkript analízisek során igazoltuk (15. ábra). Amennyiben a C-terminális *gfp* fúzió miatt a transzkripció faktor működése gátolt, akkor a *hxnR* kifejeződés önindukciója sem következik be.

Amikor azt mérlegeltük, hogy a *hxnR-gfp* konstrukciók még magas kópiaszám estén is miért csak részlegesen komplementálják a *hxnR* deléció hatását, akkor felmerült annak a lehetősége, hogy maga a recipiens *hxnR* deléciós törzs nem alkalmas komplementáció vizsgálatokra. Mivel a Chaverocé-féle genommodosítási módszer (Chaverocé és mtsai., 2000) alapján készített *hxnS* deléciós törzsben a kozmid transzformálás a *hxnR* gén több kópiás jelenlétéhez vezetett, elképzelhetőnek tartottuk, hogy a Scazzocchio csoporttal együttműködve, szintén a Chaverocé (Chaverocé és mtsai., 2000) deléciós módszerrel létrehozott *hxnR* deléciónál is hasonló események zajlottak le, amelynek eredményeként a *hxnR*-t körülvevő kozmidon hordozott genomi környezet (a *hxn* klasztergénnel) több kópiában van jelen a deléciós törzs genomjában (H.ZS.136). Úgy gondoltuk, hogy az amúgy is alacsony kópiaszámban kifejeződő *hxnR* számára a célgén promóterek számának megnövekedése szintén ronthatja a *hxn* célgének megfelelő indukcióját. A felvetésünk igazolására a *hxnR* génnel szomszédos *hxnT* gén kópiaszámát qPCR segítségével ("hxnT ReTi frw"- "hxnT ReTi rev" primerekkel) vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy a *hxnRA* törzsben (H.ZS.136) a *hxnT* gén 5 kópiában van jelen. Annak ellenőrzésére, hogy a halmozott *hxn* gén jelenléte mennyire befolyásolhatta transzformánsaink komplementációs képességét, a kozmid transzformálással létrehozott *hxnRA* törzsbe (H.ZS.136) visszajuttattuk a *hxnR*-t kódoló régiót saját promóterével és terminális régiójával. A transzformánsok (A.J. 19-23) a diagnosztikai hipoxantin táptalajon ezúttal is csak a *hxnRA* részleges komplementációját mutatták (32. ábra, B). A genomban többszörösen jelen lévő szomszédos gének miatt az integráció helyét nem tudtuk sem Southern-hibridizációval, sem PCR módszerrel ellenőrizni.

32. ábra: HZS.136 rekontitúciós törzsek vizsgálata

A: a transformánsok *hxnR* kópiaszámát ábrázolja. B: a Chaveroce-féle genommodosítási módszerrel létrehozott *hxnRΔ* rekontitúcióját követően izolált transzformánsok növekedési képességének vizsgálata. A tesztet hipoxantin táptalajon végeztük, ami 5,5 μ M allopurinol és 1 mM 6-NA kiegészítést tartalmazott. *hxnRΔ* (HZS.136): Chaveroce-féle genommodosítási módszerrel létrehozott *hxnR* deléciós törzs; *hxnR*⁺ (HZS.145): vad típusú kontroll törzs; 1-15: a *uphxnR-hxnR-down-hxnR*-t tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.136 törzsbe történő transzformációját követően izolált transzformánsok

Ez alátámasztotta azt az elképzelésünket, hogy a *hxnR-gfp* fúziós transzformánsaink esetében a genomban többszörösen jelenlévő *hxn* gének olyan mértékben lekötik a HxnR kötőhelyeit, hogy az nem tudja megfelelő mértékben indukálni a cél géneket. A következőkben elsősorban a komplementáció problémájának megoldására fókuszáltunk.

Olyan megoldást kerestünk, ahol elkerülhetjük a deléciós *hxnR* törzs használatát, de tudjuk vizsgálni a *hxnR-gfp* fúziót.

6.8.1.2. Lókuszt integrált transzformánsok vizsgálata

A három konstrukcióval végzett kísérletek, valamint a *hxnRΔ* rekontitúció növekedési tesztjének eredménye alapján felmerült bennünk, hogy a *hxnR* megfelelő kifejeződéséhez szükséges a natív genomi környezet, és esetleg az általa biztosított enhanszer elemek (ha vannak) hatásai. Bár ilyen jelenséggel korábbi munkáink során még nem találkoztunk, úgy határoztunk, építünk egy olyan transzformáló vektort, ami nagy valószínűséggel fog a *hxnR* saját genomi lókuszába beépülni, hordozza a *gfp* fúziót, és a *hxnR* lókusznál történő homológ rekombinációt segítő szekvenciákon kívül más *A. nidulans* eredetű szekvenciát nem tartalmaz. Az új, lókuszt integrációt biztosító vektort egy *nkuAΔ* recipiens törzsbe

transzformáltuk, amely az *nkuA* géntermék hiányában nem képes nem-homológ végek összekapcsolására, ezért ebben a törzsben az ektopikus integrációk lehetősége rendkívül alacsony. Ebben az esetben a homológ rekombinációt a konstrukció *hxnR* (HR1) és *hxnR* downstream (HR2) részei biztosították a *hxnR*⁺ genomi lókusza és a vektor között (33. ábra). qPCR-rel kiválogattuk a *hxnR*-t egykópiában hordozó transzformánsokat és Southern hibridizációval bizonyítottuk, hogy az integráció a *hxnR* genomi lókuszába történt.

33. ábra: Lókuszt integráció bizonyítása a konstrukciót egy kópiában hordozó transzformánsokban Southern blot analízissel

A: a B panelen látható szubsztitúciós kazetta beépülése esetén létrejövő genomi régió sematikus képe. A homológ rekombinációban ezúttal a *hxnR* (HR1) és a *hxnR* downstream (HR2) genomi régió érintett. A cikk-cakkos vonalak a *XhoI* és *BspHI* hasítóhelyeket, míg a kettős végű nyilak az ezekkel történő emésztésekből származó termékek méretét jelölik. Hibridizációs próbának a "hxnR down frw"- "hxnR down seq 1 rev" primer párokkal felszorzozott, *hxnR* downstream (HR2) régiója szolgált, amelyet az ábrán „Jelölt próba” néven jelöltünk. B: a pAN-HZS-7 vektor módosításával létrehozott szubsztitúciós kazetta sematikus képe. A szaggatott vonalak homológ rekombinációs eseményeket jelölnek. C: Vad típusú *hxnR* genomi régió sémája. upst: a *hxnR* géntől upstream elhelyezkedő szekvencia, HR1: *hxnR* gén, HR2: a *hxnR* gén downstream szomszédos szekvencia részlete. D: a Southern-hibridizációs membránt mutatja be a szülői kontroll (HZS.351) és a vizsgált transzformáns törzsek (trf1- trf6) hibridizációs jeleivel. A nyílfejek a kazettát a megfelelő genomi régióban, egy kópiában hordozó törzseket jelölik.

Az egykópiás integrációt tartalmazó törzsek, amelyekben a *hxnR-gfp* a saját lókuszában helyezkedik el, és saját promótere által fejeződik ki, egyik tesztáptalajon sem volt képes növekedni (hx+allp.+1 mM 6-NA, hx+allp.+1 mM NA, 10 mM 6-NA, 10 mM NA), és a mikroszkópos vizsgálatok során sem tudtunk fluoreszcens jelet detektálni. A jelenség magyarázatát a *hxnR* és a target *hxn* gének kifejeződésében kerestük (34. ábra). Vad típusú kontroll törzsben indukció hatására minden vizsgált gén esetében nagyfokú expresszió növekedést mutattunk ki a nem indukált mintához képest (34. ábra). Utóbbiban a *hxnR* alap

szinten megnyilvánul nem indukált körülmények között, de a cél klaszter gének, ahogyan azt már a 15. ábrán is bemutattuk teljesen inaktívak. A transzformáns törzsekben a nem-induktív körülménykor mutatott mintázat megegyezik a kontrolléval, indukzív körülmények között azonban az indukció mértéke a cél géneknél csak egy bazális szintű kifejeződést ér el, amely nem elegendő a NA hasznosítási útvonal működtetéséhez. A *hxnR* gén autoregulációja sem történik meg (34. ábra), ami azt feltételezi, hogy a *gfp* fúzióval a HxnR kötődése a promóter régiójához nem történik meg.

34. ábra: A lókuszt integrált, natív *hxnR* promóter által szabályozott *hxnR-gfp* regulált génjeinek expressziós vizsgálata

hxnR⁺: *hxnR* génre nézve vad típusú kontroll törzs (HZS.145); lókuszt int. trf1. (AJ.6): az *hxnR-gfp* lókuszt integrációját biztosító plazmidot 1 kópiában hordozó transzformáns. A törzseket 10 óráig acetamidban neveltük (nem indukáló körülmény, NI), vagy 8 óra acetamid növesztést követően 2 óráig 1 mM 6-NA-val indukáltuk (indukáló körülmény, I). A qRT-PCR adatfeldolgozást a „standard curve” módszer alapján hajtottuk végre, és a γ -aktint (*acnA*) használtuk háztartási géneként. A génpróbák indítószekvenciái a 4. mellékletben találhatók meg.

6.8.2. N-terminális *gfp-hxnR* fúziók konstrukciók vizsgálata

Mivel a C-terminálison végrehajtott *gfp* fúzió nem járt sikerrel, N-terminálisra helyezett GFP fúziót kifejező törzsek létrehozását céloztuk meg, amelyhez 5 komponensű transzformáló kazettát építettünk. A vektor építését komplikálta az, hogy a *hxnR* kódoló szekvenciát hordozó "E" komponensnél a legmegbízhatóbb polimerázok is hibákat ejtenek a magas GC tartalma miatt. Ezért olyan építési stratégiát alkalmaztunk, amelyben az "E" komponenst külön vektorba klónozzuk, és ha hibátlan a szekvencia, akkor a Double-Joint PCR módszerrel összeszerelt 4 komponensből álló kazettát klónozással hozzáépítjük. A cirkuláris plazmidot *hhoA-mRFP-AfrB*⁺ *pantoB100* *pyroA4* *veA1* (HZS.622) törzsbe transzformáltuk. A transzformánsok qPCR vizsgálatával kimutattuk, hogy a kazetta 2 és 3

kópiában integrálódott a genomba, és további PCR-rel azt is bizonyítottuk, hogy ezek közül az integrációk közül legalább egy a *hxnR* saját lókuszában belül következett be. Funkcionálisan csak a *hxnR* lókuszbba rekombinálódott kazetta nyerte el az "E" komponensen jelen levő hiányos *hxnR* hiányzó 3' részét, ezért akárhány kópiában is integrálódott a konstrukció, csak 1 kópia vesz részt a funkcionális komplementációban.

A transzformánsok, amelyekben a *hxnR* lókuszbba sikeresen rekombinálódott a kazetta, nem tudták komplementálni a *hxnR* delécióját a teszt táptalajokon. Egyedül a hipoxantin diagnosztikai táptalajon láttunk gyenge növekedést, amely a *hxnRΔ* kontrollhoz hasonlítva egyértelműen mutatkozott (35. ábra).

35. ábra: N terminális *gfp-hxnR* fúziós transzformánsok növekedési tesztje

hxnR⁺ HhoA-mRFP (H.ZS.622): recipiens kontroll törzs; *hxnR⁺* (H.ZS.145): vad típusú kontroll törzs; 9 (A.J.8): 3 kópiás integrációt hordozó transzformáns, 15 (A.J.7): a cirkuláris konstrukciót 2 kópiában hordozó transzformáns.

Hogy meggyőződjünk arról, hogy a homológ rekombinációval beépült kazettában hibátlanul rekonstruálódott a *hxnR* gén, a kétkópiás transzformánsban (H.ZS.622 trf/15 transzformáns) szekvenálással ellenőriztük a *hxnR* lókuszt. Nem találtunk hibát.

Azért, hogy halmozott integrációban vizsgálhassuk a *gfp-hxnR* komplementációját, létrehoztuk a *hxnR* delécióját a Double-Joint PCR módszer alkalmazásával (5.27.3.5 pont) (Yu és mtsai., 2004), és ebbe a törzsbe (H.ZS.668) transzformáltuk az előbbieken szekvenálással ellenőrzött PCR terméket, amely nem csak a részleges *hxnR* ORF-et hordozó transzformáló kazettát, de a *hxnR* gén teljes ORF régióját tartalmazza (36. ábra, A). PCR vizsgálattal sikerült 1 és halmozott kópiás integránsokat is azonosítani.

36. ábra: N-terminális *gfp* fúziós kazettával történő transzformálást követően izolált transzformánsok vizsgálata

A: Az 5 komponensű N-terminális *gfp* fúziós kazetta sematikus ábrázolása B: A transzformánsok *gfp-hxnR* kópiaszámát ábrázolja C: A B panelben feltüntetett transzformánsok (4-37: AJ. 9-14) komplementációs képességének ellenőrzése, a recipiens *hxnRΔ* törzsszel (HZS.668) kiegészítve. A tesztet 5,5 μ M allopurinol és 1mM 6-NA-val vagy NA-val kiegészített hipoxantin, és 10 mM NA-t vagy 10 mM 6-NA-t tartalmazó táptalajokon végeztük.

A *hxnR* saját lókuszába, egy kópiában integrálódott *gfp-hxnR* kazetta a deléciós fenotípust most is csak részlegesen komplementálta (36. ábra, B, C), de egyes több kópiás integránsok hipoxantin táptalajon szinte teljes fenotípus egyezést mutattak a vad típusú kontroll törzsszel. A transzformánsok azonban NA és 6-NA nitrogén forráson még magas *hxnR* kópiaszám esetén sem képesek növekedni, ami arra utal, hogy a C-terminális *hxnR-gfp* fúzióhoz hasonlóan az N-terminális *gfp-hxnR* fúzióban sem tud a HxnR minden *hxn* gén

promóterrel együttműködni. A hipoxantin teszt alapján biztosan állíthatjuk, hogy ha a *gfp-hxnR* konstrukció 4-5 kópiaszámban van jelen, a Gfp-HxnR a *hxnS* promóterrel majdnem tökéletesen együttműködik (36. ábra, B, C). Az is biztos, hogy az inducer mennyiségben táptalajhoz adott 1 mM NA vagy 6-NA legalább addig metabolizálódik jól az útvonalban, amíg az igazi metabolit inducer létrejön, hiszen az igazi inducer az, ami a HxnR-t illetve Gfp-HxnR-t aktiválja és az aktivált transzkripció faktor pedig indukálja a HxnS kifejeződését. A transzformánsokkal mikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk (hx+allp.+1mM 6-NA indukciós tápoldatban növesztve), de a HxnR a saját promóterével kifejezve 5 kópiában sem érte el a detektálhatóság határát.

Elvégeztük a Double-Joint PCR módszer alkalmazásával létrehozott *hxnRΔ* törzs (HZS.668) rekonstitúciós vizsgálatát is (37. ábra).

A

Trf.-ok száma	<i>hxnR</i> +	<i>hxnRΔ</i>	2	3	4	5	6
Kópia szám	1	0	1	2	0	1	1

B

37. ábra: A Double-Joint PCR technikával létrehozott *hxnRΔ* (HZS.668) törzs rekonstitúciója.

A: az up *hxnR*-*hxnR*-down *hxnR* kazettát hordozó transzformánsok (AJ.15-18) *hxnR* integrációinak száma B: Az izolált transzformánsok növekedési tesztje hipoxantin, 5,5 μ M allopurinol és 1mM 6-NA vagy NA, és 10 mM NA vagy 10 mM 6-NA tartalmú teszt táptalajokon.

Minden izolált transzformánsban csak ektopikus integrációt sikerült azonosítanunk, ennek ellenére már a *hxnR* gént egy kópiában hordozó transzformáns esetén is minden diagnosztikus táptalajon a növekedés helyreállítását tapasztaltuk (37. ábra).

A különböző GFP konstrukciókat kifejező törzseink vizsgálati eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a GFP jelenléte minden esetben gátolta a HxnR megfelelő működését, így a *hxn* gének megfelelő regulációját. Annak magyarázatára, hogy az N- és C-terminálisra épített fúziós fehérje kifejeződésekor miért különböznek a törzsek a nitrogénforrás hasznosításukban, az AreA koregulátor szolgálhat. Korábban már qRT-PCR vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a HxnR mellett az AreA is pozitív szabályozóként hat a *hxn* promótereken. Úgy gondoljuk, hogy az AreA kötőhelyek *hxn* promóterenként eltérő elrendeződése a HxnR kötőhelyekhez képest jól magyarázza az N- és C-terminálisra épített fúziós fehérjék kifejeződésekor kapott eltérő N-forrás hasznosítási mintát. Ez alapján attól függően, hogy az AreA kötőhely a HxnR kötőhelyhez képest hol helyezkedik el egy *hxn* gén promóterén, a HxnR-Gfp fúziós fehérje kevésbé vagy egyáltalán nem fér hozzá a természetes kötőhelyekhez, és a fúziós fehérje hozzáférése a promóteréhez *hxn* génenként változik. A legrosszabb esetben az AreA kötőhely annyira közel van a HxnR kötőhelyhez, hogy az egyik fúziós fehérje egyáltalán nem fér hozzá a HxnR helyhez, de a másik oldalra helyezett fúziós fehérje képes kapcsolatot kialakítani a kötőhelyével. Ezért variál a növekedési képesség a fúzió helyzetét tekintve.

Végző soron a GFP fúziós fehérje nem összeegyeztethető az HxnR működésével, ezért az intracelluláris lokalizáció vizsgálatára irányuló erőfeszítéseinket publikálható eredmény nélkül lezártuk tekintjük.

7. Összefoglalás

Az 1990-es években megnőtt azon kutatások száma, melyek az aromás heterociklusos gyűrűk mikrobák általi lebontását vizsgálták. Céljuk az alapkutatáson túlmenően olyan mikrobiális enzimek azonosítása volt, melyeket bevonhatnak a gyógyszer- és növényvédőszer alapanyagok előállításába és ezáltal csökkenthetik a hatóanyagok előállítási költségeit (Schmid és mtsai., 2001; Nakano és mtsai., 1999; Ueda és mtsai., 1998).

Az évek során számos prokarióta szervezetet azonosítottak, melyek képesek a nikotinsavat (NA) lebontani, szén- és nitrogénforrásként hasznosítani, de az eukarióták katabolikus útvonalának feltárása máig sem történt meg. Scazzocchio és mtsai. a purin lebontási útvonal tanulmányozása során már az 1960-as években felismerték, hogy az *A. nidulans* modellszervezetben a NA lebontásában a purin hidroxiláz I-hez (PHI) nagyon hasonló enzim, a PHII esszenciális feladatot lát el (Glatigny és Scazzocchio, 1995; Glatigny és mtsai., 1998). Bár a PHII sok hasonlóságot mutat a PHI-el, számos biokémiai jellemzőjében eltér attól. Mindkettő NADPH-dehidrogenáz aktivitással rendelkező molibdoprotein, amelyek Moco-t és szulfurilációt igényelnek az aktív enzim kialakulásához. A PHI-hez hasonlóan a PHII is képes a hipoxantint szubsztrátként felhasználni és xantinná hidroxilálni, de a xantin további átalakítását már nem tudja elvégezni. Egyedi módon a NA-t is képes szubsztrátként kötni és azt 6-hidroxi-nikotinsavvá (6-NA) alakítani. A kísérletek során azonban PHII enzimaktivitást csak akkor tudtak detektálni, ha a tápoldatban alkalmazott nem-represszálo nitrogénforrás mellé inducer mennyiségben NA-t, vagy 6-NA-t adagoltak, ami azt sugallta, hogy a PHII nem a purin lebontási útvonal, hanem a NA katabolikus útvonal szabályozása alatt áll. Ezen úttörő ismeretek nyomán, valamint a Prof. Scazzocchio által izolált és rendelkezésünkre bocsájtott, NA hasznosításban sérült és a Scazzocchio csoportjával kollaborációban készült *hxnS* és *hxnR* deléciós törzsek birtokában kutatócsoportunk elsőként kezdte el az *A. nidulans* eukarióta modellszervezetben a NA katabolikus útvonal részletes feltárását.

Mivel a PHI és PHII vélhetően paralóg fehérjék, a Scazzocchio csoporttal együttműködve sikerült azonosítani és deletálni a feltételezett *hxnS* gén leolvasási keretét. Deletáltuk továbbá a *hxnS* szomszédos génjét is, ami feltételezésünk szerint a NA hasznosítási útvonal specifikus transzkripciós faktorát, a *hxnR*-t kódolja. A deléciós mutánsokkal folytatott munkák során a későbbiekben fény derült arra, hogy a Chaverocce-féle genommodosítási módszer (Chaverocce és mtsai., 2000) alkalmazása komoly hátrányokkal jár, amelyeket a

deléció létrehozásának idején még nem ismertünk. Ezért a Double-Joint PCR technikát alkalmazva, munkám részeként újra deletáltuk a géneket.

Munkánk első lépéseként a Scazzocchio törzsgyűjteményéből származó deléciók (*hxnSΔ*) és PHII enzimaktivitásban gátolt (nem képesek allopurinollal és 1 mM 6-NA-val kiegészített hipoxantin táptalajon nőni, *hxnS29*, *hxnS35* és *hxnS41*) mutánsokkal végeztünk növekedési és enzim aktivitás teszteket, melyekkel bizonyítottuk, hogy a PHII enzimet a *hxnS*, a HxnR-t pedig az AN11197 gén kódolja.

A mutagenézissel létrehozott funkcióvesztett mutánsokban szekvenálással azonosítottuk az enzimaktivitás hiányáért felelős változásokat: *hxnS35*-ben a 98. aminosav non-sense mutációja, *hxnS41*-ben az 1162. pozícióban lévő aminosav lánc terminációt előidéző mutációja eredményezte a PHII enzim működésének teljes gátlását, míg a *hxnS29* konzervált régióján belül bekövetkezett aminosav csere a PHII enzim csökkent aktivitását okozta.

Azonosítottuk a *hxnS* cDNS szekvenciáját, majd részletes összehasonlítást végeztünk a PHI (HxA), PHII (HxnS) és a kémilailag már jól jellemzett *B. taurus* xantin dehidrogenáz aminosav szekvenciáival, és kijelöltük azokat az aminosavakat, amelyek konzerváltak nem csak a HxnS, de az adatbankban található összes HxnS paralóg esetében.

Több száz HxnS ortológ összehasonlító elemzése alapján, a HxnS konzervált régiói, amelyek különböznek mind HxA-ban mind pedig a *B. taurus* XDH-ban, fontosnak tűnnek a HxnS szubsztátpecifitása szempontjából. Ezek a vizsgálati eredmények a közeljövőben *in vitro* enzim-evolúció tanulmányok alapját képezik.

Megvizsgáltuk a NA katabolikus útvonal specifikus transzkripciós faktorának (HxnR) szerkezetét. A *hxnR* egy Cys2His2 cink-ujj proteint kódol, aminek a C-terminális részén elhelyezkedő 2 CysHis2 motívumát NLS (VLRTRKMRRA) és NES (LDIDL) szignálok, valamint a 394 és 668 aminosavak között gomba-specifikus transzkripciós faktor domének követnek. A jövőben ezek az eredmények az NLS és NES kísérletes úton történő igazolásának alapját képezik.

Konstitutív HxnR mutánsok izolálásával és elemzésével megkezdjük a HxnR funkció vizsgálatát. A konstitutív *hxnR* allélok szekvencia analízise során azonosítottuk azokat az AS változásokat, melyek a fehérje konstitutív kifejeződéséhez vezettek. Az eredmények alapján úgy véljük, hogy a 226. és 228. pozícióban valószínűleg aromás AS-nak, a 605. pozícióban pedig bázikus AS-nak kell lenni ahhoz, hogy a protein fiziológiailag inaktív állapotban legyen a valódi inducer megjelenéséig.

123 lehetséges *Pezizomycotina* ortológ faj fehérje szekvenciáit felhasználva elkészítettük a HxnR CONSURF modelljét, majd 3D ábrázolását. A *hxnR* mutánsok szekvenálása során azonosított konstitutivitást valamint funkcióvesztést okozó mutációk mindkét modell esetén erősen konzervált régióra térképeződtek, melyek a 3D modell alapján a fehérje külső felszínén, egymással szemben lokalizálódnak.

A *hxnS* és *hxnR* genomi kapcsoltsága alapján felmerült a lehetősége annak, hogy a prokarióta NA degradációs útvonalakhoz hasonlóan, az útvonal génjei *A. nidulans*-ban is klaszterekben rendeződnek (Jimenez és mtsai., 2008). A *hxnS* és *hxnR* környezetében található gének expressziós mintázatának vizsgálatával további 4 gént (*hxnP*, *hxnT*, *hxnZ* és *hxnY*) azonosítottunk, melyek koregulációt mutatnak és csak NA vagy 6-NA indukció hatására fejeződnek ki. Az eredményeknek köszönhetően egy 6 génből álló génklasztert azonosítottunk a VI. kromoszómán, amit *hxn* klaszternek neveztünk el.

Expressziós analízisek során bebizonyosodott, hogy a transzkripció faktorokra jellemző tulajdonságokkal bíró HxnR a klaszter mind az 5 génjének a kifejeződéséhez esszenciális (nitrogénéhezés alatt is). A qRT-PCR eredmények alátámasztották, hogy a gén nem represszált körülmények között derepresszálódik és inducer jelenlétében képes a saját génkifejeződését fokozni (autoreguláció), valamint fény derült arra is, hogy a korábban neutrálisnak vélt urea nitrogénforrás, kísérleti rendszerünkben gátló nitrogénforrásként hat (véltetően akár nyomnyi mennyiségű ammónium jelenléte miatt).

Génexpressziós vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a HxnR mellett, a nitrogénforrás hasznosítási útvonalakban (pl. nitrát- NirA; Arst és Cove, 1973; Caddick és mtsai., 1994) gyakran ko-regulátorként ható AreA a NA lebontási útvonalban is esszenciális a klaszter gének kifejeződéséhez és pozitív szabályozóként fejt ki hatását.

Kísérletesen bizonyítottuk azon felvetést, miszerint a NA degradációs útvonal génjeinek inducere nem maga a NA, de nem is a 6-NA, hanem a lebontási útvonal egy későbbi köztiterméke.

Kimutattuk, hogy a *hxnP* adatbanki szekvenciája hibás és kijelöltük a negyedik intron valószínű pozícióját.

A *hxn* gének *in silico* vizsgálatait követően Double-Joint PCR módszerrel (Yu és mtsai., 2004) elvégeztük a klaszter gének delécióját, majd analizáltuk a mutánsokat.

- a HxnP egy transzmembrán fehérje, mely valószínűleg a NA, a 6-NA és a NAA alacsony affinitású transzportere (legközelebbi homológja a *S. cerevisiae* NA transzportere (Llorente és Dujon, 2000))

- a HxnZ szintén transzmembrán fehérje, mely valószínűleg az útvonal aromás metabolitjait transzportálja (homológja többek között a *S. cerevisiae* magas affinitású foszfát transzportere (Bun-Ya és mtsai., 1991), a *C. albicans* morfológiai váltásában résztvevő transzportere (Lan és mtsai., 2002), emlős szerves anion és kation transzporterek (Sekine és mtsai., 1997))
- a *hxnT* egy NADH dehidrogenáz aktivitással rendelkező flavin oxidoreduktázt kódol (Oxidored_FMN, PF00724, legközelebbi struktúrális homológja a paradicsomból izolált 12-oxopfitodienoát-reduktáz-3 (Breithaupt és mtsai., 2006)). A NADH dehidrogenáz tulajdonságát enzim aktivitás vizsgálattal kísérletesen igazoltuk.
- a HxnY egy α -ketoglutarát függő dioxigenáz, melynek szubsztrátja valószínűleg egy zárt piridin gyűrűvel rendelkező NA származék (legközelebbi homológja *N. crassa* timin-7-hidroxiláza (Li és mtsai., 2015)).

A deléciós mutánsokkal végzett növekedési tesztek során egyik gén deléciója sem okozta a 6-NA hasznosítás képességének teljes elvesztését, ami megerősíti azt az elképzelést, hogy a 6-NA metabolizmusa több útvonalon keresztül zajlik, melyben ezen a klaszteren kívül található gének is részt vesznek, amik szintén a *hxnR* szabályozása alatt állhatnak.

A NA lebontási útvonal regulátorának (HxnR) funkció vizsgálatát a fehérje intracelluláris lokalizációjának tanulmányozásával egészítettük ki, C-terminális és N-terminális HxnR-GFP fúziós protein létrehozásával, nem-indukált, indukált és indukált-represszált körülmények között. A C-terminális Gfp fúzió esetében háromféle konstrukciót hoztunk létre, amelyekben a HxnR-t működtető promóter különböző volt. A natív promóter mellett a konstitutív *gpdA* és a prolin indukálható *prnD* promóterekkel is konstrukciókat építettünk, de egyik konstrukció transzformálását követően sem sikerült olyan transzformánsokat izolálni, melyek képesek lettek volna a *hxnRA* fenotípust egy kópiában komplementálni. Azok a transzformánsok, amelyek nagyobb példányszámban tartalmazták a konstrukciókat, csak 6-NA és a diagnosztikai hipoxantin táptalajon (1 mM 6-NA inducerrel) mutattak részleges komplementációt, míg NA nitrogén forráson egyáltalán nem voltak képesek növekedni. A későbbiekben bizonyítottuk, hogy a transzformálás során alkalmazott *hxnRA* recipiens törzsben (HZS.136) a *hxnR*-t határoló gének halmozottan vannak jelen. Azt feltételezzük, hogy a *hxnR-gfp* fúziós transzformánsok 6-NA-n és hipoxantin+allp.+1 mM 6-NA táptalajon mutatott alacsony szintű részleges komplementációjáért a *hxnRA* törzsben megnövekedett számban levő *hxn* gének promóterei a felelősek, amelyek gyakorlatilag kihígítják a rendelkezésre álló HxnR molekulákat a promótereken. A NA-n tapasztalat komplementáció hiánya pedig magyarázható azzal, hogy a HxnR-GFP nem képes megfelelően együtt működni

a HxnS promóterrel, de a többi *hxn* gén elegendő mértékben kifejeződik ahhoz, hogy hipoxantin táptalajon részlegesen komplementálják a *hxnRA* fenotípust (pl. *hxnY*, *hxnP*). Ez a hipotézis korrelál azzal az eredményünkkel, mellyel bizonyítjuk, hogy a HxnR mellett az AreA is pozitív szabályozóként hat a *hxn* promótereken. Ez azt jelenti, hogy attól függően, hogy az AreA kötőhely hol helyezkedik el egy *hxn* gén promóterén, a HxnR-Gfp fúziós fehérje kevésbé vagy egyáltalán nem fér hozzá a természetes kötőhelyéhez. A legrosszabb esetben az AreA kötőhely annyira közel van a HxnR kötőhelyhez, hogy a fúziós fehérje nem fér hozzá a HxnR helyhez.

A *hxnR* gén delécióját a Double-Joint PCR módszerrel újra elvégeztük, és olyan *hxnRA* törzset (HZS.668) kerestünk, amely a deléciós kazettát egyetlen kópiában tartalmazza. Ezt követően mindkét *hxnR* deléciós törzs (HZS.136 és HZS. 668) rekonstitúcióját elvégeztük, amellyel igazoltuk fenti hipotézisünket, miszerint a *hxn* promóterek nagy száma okozza a *hxn* gének aktivitásának csökkenését.

Az új deléciós *hxnR* törzs létrehozásával párhuzamosan készítettünk egy olyan C-terminális HxnR-GFP fúziós proteint, ami nagy valószínűséggel a *hxnR* saját genomi lókuszába épül be, hordozza a *gfp* fúziót, és a *hxnR* lókusznál történő homológ rekombinációt segítő szekvenciákon kívül más *A. nidulans* eredetű szekvenciát nem tartalmaz. A konstrukciót *hxnR*⁺ törzsbe transzformáltuk és olyan transzformánsokat szelektáltunk, amelyekben a kazetta a *hxnR* saját lókuszába integrálódott. A kísérlet során egyetlen transzformánst sem sikerült izolálni, ami tudott volna nőni NA, 6-NA vagy hipoxantin táptalajokon. qRT-PCR módszerrel kimutattuk, hogy sem a klaszter gének indukciója, sem a *hxnR* autoregulációja nem volt sikeres. Az eredmény arra utalt, hogy a HxnR C-terminálisán a GFP megakadályozza a transzkripció faktor aktiválását és/vagy kötődését a promóteréhez.

A C-terminális fúzió kudarcát követően, amino-terminális GFP-HxnR fúziót hoztunk létre. Sajnos a HxnR N-terminális részével fuzionáltatott GFP-s konstrukció esetén is hasonló tapasztalataink voltak. Bár a kazettát hordozó transzformánsok komplementációja nagyobb kópiaszám esetén szinte teljesnek tekinthető hipoxantin táptalajokon (hx+allp.+1 mM NA vagy 1 mM 6-NA), az egykópiás *gfp-hxnR* lókuszt integrált törzs növekedése messze elmarad az egykópiás rekonstitúciós törzsnél (HZS.668) tapasztalt növekedéstől. Ráadásul NA és 6-NA táptalajokon nem történt komplementáció még magas kópiaszám esetén sem. A komplementációs eredményeket azzal magyarázhatjuk, hogy ebben az esetben a GFP-HxnR a HxnS promóterrel jól együtt tudott működni, aminek köszönhetően a hipoxantin táptalajon különösen jó növekedés figyelhető meg. Mivel a NA és a 6-NA hasznosításához más *hxn* gének megfelelő kifejeződése is szükséges, a GFP-HxnR hibás működése már egyetlen *hxn*

promóteren is 6-NA (pl. *hxnT*) vagy NA hasznosítási rendellenességet okozhat. Ezek az eredmények is alátámasztják azt a hipotézisünket, hogy az Are és HxnR kötőhelyek különböző elrendeződésűek a különböző *hxn* promótereken.

Mindezeket összegezve elmondhatjuk, hogy mind a C-terminális, mind pedig az N-terminális részhez fúzionáltatott GFP zavarja a HxnR funkcióját, ezáltal alkalmatlannak bizonyult a fúziós fehérje a HxnR fiziológiás intracelluláris lokalizációjának vizsgálatára. A *PprnD* promóteres *hxnR-gfp* transzformánsok esetében a fluoreszcens mikroszkópia során tapasztalt konstitutív sejtmagi jelenlét valószínűleg a HxnR-Gfp túltermelődése miatt történhetett, és nem feltétlen tükrözi a természetes élettani helyzetet. Annak tudatában, hogy az NLS mellett a HxnR-ben NES is jelen van, a protein nukleusz és citoplazma közötti mozgását feltételezzük továbbra is.

8. Summary

In the 1990s, the investigation of catabolism of heterocyclic rings by microbes increased significantly in order to make the production of bioactive drugs (herbicides and human therapeutic drugs) more cost-effective (Schmid *et al.* 2001; Nakano *et al.* 1999; Ueda *et al.* 1998). Although many prokaryotic organisms have been identified in the last few years, which can utilize nicotinic acid (NA) as nitrogen and/or carbon sources, the eukaryotic NA catabolic pathway(s) have not been studied yet. During the work on the purine utilization pathway, Scazzocchio *et al.* (Glatigny and Scazzocchio, 1995; Glatigny *et al.*, 1998) recognized that in the model organism *A. nidulans*, PHII plays an essential role in NA utilization and at the same time it shares functional similarities with the purine catabolic pathway enzyme, purine hydroxylase I (PHI). In addition to the similarities, PHII differs from PHI in many aspects. PHII is able to carry out the hydroxylation of hypoxanthine to xanthine (as PHI), but unable to catalyze the further hydroxylation of xanthine. Uniquely, PHII has a new substrate, the NA, which is hydroxylated to 6-NA acid. During their experiments they could detect PHII enzyme activity only when the non-repressing nitrogen source media was supplemented with inducer concentration of NA or 6-NA, therefore PHII seemed to be devoted to the NA catabolic route instead of the purine catabolic pathway. For the first time the investigation of the eukaryotic NA catabolic process has been started by our research group. We gained access to some of the loss-of-function and gain-of-function mutants obtained in 1960's by work of C. Scazzocchio and those *hxnS* and *hxnR* deletion strains that were made in collaboration with Prof. Scazzocchio's group. Earlier studies (Glatigny and Scazzocchio, 1995; Glatigny *et al.*, 1998) indicated that the PHI enzyme is very similar to PHII. Both are molybdenoproteins with NADPH dehydrogenase activity, which require Moco and a sulfurylation for the formation of the active enzyme. Since PHI and PHII were proposed to be paralogs, together with the Scazzocchio team we identified and deleted the possible gene of PHII and a neighboring gene, which we surmised to be the coding gene of the route-specific transcription factor, HxnR. Unfortunately, those deletions had to be re-done in our laboratory, since at the time of the first deletion, the applied deletion method had serious drawbacks, which were not recognized at that time.

First, we carried out growth tests and enzyme activity assays with the available PHII mutants (*hxnS29*, *hxnS35* and *hxnS41*, unable to grow on hypoxanthine media supplemented with allopurinol and 1 mM NA or 6-NA), and we demonstrated that *hxnS* is the coding gene of PHII and AN11197 is the coding gene of HxnR.

We sequenced the available loss of function mutants and identified those nucleotide changes, which are responsible for the loss of enzyme activity. It was a non-sense mutation in amino acid 98 in *hxnS35*; chain termination mutation of the amino acid at position 1162 in *hxnS41* that resulted in the complete inhibition of the PHII enzyme; amino acid substitution within the conserved region in *hxnS29* that caused the decreased activity of the PHII enzyme.

We identified the cDNA sequence of HxnS. We made a detailed comparison between PHI (HxA), PHII (HxnS) and the biochemically well-characterized xanthine dehydrogenase (XDH) of *B. taurus*. We defined amino acid residues which are conserved in not only HxnS, but all the paralogs of HxnS found in the fungal genom database. According to the comparative analysis of more than one hundred HxnS orthologs, the chosen conserved residues of HxnS, which differ in HxA and XDH of *B. taurus* are thought to be important for the HxnS substrate specificity. These results form the foundation of an *in vitro* enzyme evolution study in the future.

We investigated the structure of the NA catabolic route specific transcription factor, HxnR. HxnR is a Cys2His2 Zinc-finger protein, with two Cys2His2 boxes at the amino-terminus followed by NLS (VLRTRKMRRRA) and NES (LDIDL) signals and a fungal specific transcription factor domain between amino acid residues 394 and 668. These results serve the bases of a future study on the experimental identification of the NLS and NES signals of HxnR. We started the functional analysis of HxnR by the isolation and analysis of HxnR constitutive mutants. Since we reached saturation of the constitutive mutations, we think that we identified all those nucleotide changes, which resulted in constitutivity. We proposed that an aromatic amino acid at positions 226 and 228 and a basic amino acid in the position 605 is pivotal to maintain the protein in its physiological inactive state in the absence of an actual inducer.

We made a CONSURF alignment of HxnR with 123 putative Pezizomycotina orthologues and mapped all the known loss-of-function and constitutive mutations onto the protein and to the 3-dimensional model we made according to the consurf data. Those residues, which are responsible for the loss-of-function or gain-of-function mapped to the two opposite ends of the outer surface of the protein.

On the basis of the close genomic linkage of *hxnR* and *hxnS*, we reasoned that similarly to prokaryotic NA degradation pathway genes, the *A. nidulans* NA catabolic pathway genes also might be orgained in a cluster (Jimenez *et al.*, 2008). Through the systematic expression profile analysis of *hxnS*, *hxnR* and the neighbouring genes, further 4 genes (*hxnP*, *hxnT*, *hxnZ* and *hxnY*) showing co-regulation were identified. The cluster of six genes on chromosome VI

was named the *hxn* cluster. All the cluster genes were expressed only in response to NA and 6-NA induction in wild type control and their expression depended on HxnR. The gene expression studies revealed that *hxnR* is derepressed under non-repressed conditions and is able to enhance its own gene expression in the presence of an inducer (autoregulation). We also demonstrated that urea (previously considered as neutral nitrogen source) acts as an inhibitory nitrogen source in our experimental system (probably due to the presence of minimal amount of ammonium contamination).

We also found out that besides HxnR, the AreA (often acting as a co-regulator in the nitrogen source utilization pathways (e.g. nitrate (Arst and Cove, 1973; Caddick *et al*, 1994)), is also essential for the expression of the *hxn* cluster genes and acts as a positive regulator.

We have demonstrated that the inducer of NA degradation pathways is not the NA or 6-NA but a downstream intermediate of the degradation route.

We confirmed that the sequence of HxnP protein is incorrect in the database, and we designated the real position of the fourth intron.

After *in silico* analysis of the *hxn* gene products we deleted the cluster genes using the Double-Joint PCR method (Yu *et al*, 2004) and analysed the deletion mutants.

- HxnP is predicted to be a transmembrane protein of the Major facilitator superfamily, probably it is the low affinity transporter of NA, 6-NA and nicotinic acid amid (NAA) (the nearest characterised homologue of HxnP is *TNAI*, the nicotinate transporter of *S. cerevisiae* (Llorente and Dujon, 2000)).
- HxnZ is also a predicted 12-TMS transporter of the MFS1 superfamily, most probably it transports the aromatic metabolites of the route (homologous to a high-affinity phosphate transporter in *S. cerevisiae* (Bun-Ya *et al.*, 1991), *C. albicans* transporter involved in morphological switching (Lan *et al.*, 2002), and mammalian organic anion and cation transporters (Sekine *et al.*, 1997)).
- *hxnT* gene encodes a flavin oxidoreductase with NADH dehydrogenase activity (Oxidored_FMN, PF00724, the nearest structural analogue of HxnT is 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato, Breithaupt *et al.*, 2006). NADH dehydrogenase activity of HxnT was experimentally confirmed by enzyme assays.
- HxnY is an α -ketoglutarate dependent dioxygenase. It is probable that the substrate of HxnY is a nicotinate derivative, with a closed pyridine ring (the nearest structural analogue of HxnY is thymine-7-hydroxylase of *N. crassa* (Li *et al.*, 2015)).

In growth tests of deletion mutants, none of the deletions caused the complete loss of 6-NA utilization capacity, confirming the idea that the metabolism of 6-NA occurs through multiple pathways involving genes outside this cluster, which may also be under the control of *hxnR*.

Intracellular localization of the NA degradation pathway regulator HxnR was studied through C-terminal and N-terminal Gfp fusions under non-induced, induced and induced-repressed conditions. For the C-terminal Gfp fusion we developed three types of constructions, in which the operating promoter was different. In addition to the native promoter, we also made constructions with the constitutive *gpdA* and the proline inducible *prnD* promoters. None of the constructions provided transformants, which were able to complement the deletion phenotype in a single copy number. Those transformants, which contained the construct in high copy number showed a partial complementation only on 6-NA and the HxnS diagnostical hypoxanthine medium while showed no complementation on NA.

In fact, we introduced our constructions in the first available *hxnRΔ* (HZS.136) mutant and found out that the mutant carries other *hxn* genes flanking the *hxnR* locus, in multycopy. We surmised that the low and partial complementation of deletion phenotype by the *hxnR-gfp* fusion on 6-NA might be due to the increased number of *hxn* promoter sites in the *hxnRΔ* strain, which practically dilute the available HxnR molecules from the promoter regions. We explained the lack of complementation on NA medium by supposing that HxnR-Gfp does not work appropriately on HxnS promoter, but is able to interact with other *hxn* promoters at a better level (eg. *hxnY*, *hxnP*). This hypothesis correlates to our result, in which we reveal that beside HxnR, AreA also acts as a positive coregulator on the *hxn* promoters. It means that depending on where AreA binding sites are positioned on an *hxn* promoter, the HxnR-Gfp fusion protein might have less or no access to its natural binding site. In the worst scenario AreA binding site is so close to the HxnR binding site that the fusion protein does not gain access to the HxnR site.

By carrying out the deletion of *hxnR* gene with the Double-Joint PCR method we obtained a single copy integration carrying, new *hxnRΔ* strain (HZS.668). We carried out *hxnR* reconstitution in both *hxnRΔ* strains (HZS.136 and HZS.668) and proved our hypothesis about the increased number of *hxn* promoters resulting in decreased activation of *hxn* genes.

During the development of the new *hxnRΔ* strain, we created an *hxnR-gfp* construct driven by native promoter and integrated it into the *hxnR* locus. This construct was transformed into an *hxnR⁺* strain and *hxnR* locus integration carrying transformants were identified. Neither of

the transformants showed complementation on the tested NA, 6-NA and hypoxanthine medium. In qRT-PCR experiments we showed that neither the induction of cluster genes nor the autoregulation of *hxnR* was successful upon single copy *hxnR-gfp* integration. The result revealed that GFP at the C-terminus of HxnR prevents the activation and/or binding of the transcription factor to its promoter sites.

Upon the failure with the C-terminal fusion we developed amino-terminal fusion Gfp-HxnR. Unfortunately, we got similar result as with the carboxy-terminal fusion. The single copy transformants showed no complementation on the tested NA, 6-NA and a little complementation on hypoxanthine medium, while the multycopy transformants showed a partial complementation on these media. Remarkably, the partial complementation was detected on hypoxanthine medium, while no complementation was seen on NA and 6-NA media. We explain the complementation results by supposing that Gfp-HxnR operates very well with HxnS promoter, hence the particularly good growth on hypoxanthine medium is observed. Since NA and 6-NA utilization need the proper expression of other *hxn* genes, failure of Gfp-HxnR on even one of the downstream pathway related *hxn* promoters can result in the failure on NA or 6-NA utilization. These results further support our hypothesis of different arrangements of Are and HxnR binding sites on the different *hxn* promoters. All in all, both C-terminal and N-terminal GFP fusion of HxnR interferes with the HxnR function, thus they are inadequate to examine the physiological intracellular localization of the protein. The constitutive nuclear localisation seen in the *prnD* promoter driven *hxnR-gfp* carrying transformant was probably due to the overproduction of HxnR-GFP and the localization did not necessarily reflect the natural physiological events. Knowing that beside NLS a NES is also present on HxnR, shifting of the protein between nucleus and cytoplasm would be reasonable to presume.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönöm Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszékének vezetőjének, amiért lehetővé tette számomra, hogy szakdolgozói éveim után PhD munkámat is a tanszéken végezhessem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Hamari Zsuzsannának útmutatásáért és támogatásáért, és azért, hogy az elmúlt 8 év során áldozatkészen irányította és segítette munkámat. Bátorítása és támogatása nagyban hozzájárult dolgozatom elkészüléséhez.

Szeretném megköszönni Dr. Karácsony Zoltánnak kitartó türelmét és szakdolgozói illetve PhD éveim kezdetén nyújtott segítségét, aminek köszönhetően laboratóriumi alapismereteimet elsajátíthattam. Köszönöm Dr. Németh Tibor molekuláris módszerekkel kapcsolatos segítségét, és hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá.

Külön köszönettel tartozom Bokor Eszternek a kísérleteim elvégzéséhez nyújtott segítségéért. Köszönöm Dr. Farkas Zoltánnak a konfokális lézer szkennelő mikroszkópos felvételek elkészítéséhez, Dr. Sinka Ritának a fluoreszcens mikroszkópós vizsgálatokhoz nyújtott segítségét. Köszönöm Claudio Scazzocchio-nak a 3D modellek és illesztések elkészítésében nyújtott segítségét, és hogy szakmai tanácsaival támogatta kutatásunkat. Köszönöm Michel Flippin-nek az *in silico* analízisekhez nyújtott hozzájárulását.

Köszönöm a 301.-es labor valamennyi dolgozójának, különösképpen Papp Csabának, Szenzenstein Juditnak, Zajta Eriknek, Tóth Renátának, Csonka Katalinnak, Pál Sárának, Vadovics Máténak és Bohner Flórának hogy mindig a laboruk tagjaként tekintettek rám. Köszönettel tartozom Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a sok technikai segítségért, Lengyel Boglárkának és Csordás Anitának a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek intézéséért.

Szeretném megköszönni Steigler Anett és Dr. Tóth Liliána lelki támogatását, biztatását, bátorítását és baráti jó tanácsait.

Külön köszönet illeti Családomat és Páromat, akik támogatásukkal mindig segítettek tanulmányaimat és akiknek biztató szavai nagyban hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi volt és jelenlegi dolgozóinak, akik hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Jelen kutatás az OTKA-K101218, NKFI-K16 119516, a GINOP-2.3.2-15-2016-00035 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 pályázatok támogatásával valósult meg.

10. Irodalomjegyzék

- Abreu, C., M. Sanguinetti, et al. (2010). "UreA, the major urea/H⁺ symporter in *Aspergillus nidulans*." Fungal Genet Biol **47**(12): 1023-1033.
- Ádám, V., Ed. (2016). Orvosi Biokémia, Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió.
- Alhapel, A., D. J. Darley, et al., (2006). "Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in *Eubacterium barkeri*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12341-12346.
- Ámon, J., R. Fernandez-Martin, et al. (2017). "A eukaryotic nicotinate-inducible gene cluster: convergent evolution in fungi and bacteria." Open Biol **7**(12).
- Amrani, L., G. Cecchetto, et al., (1999). "The *hxB* gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems." Mol Microbiol **31**(4): 1065-1073.
- Amrani, L., J. Primus, et al. (2000). "Comparison of the sequences of the *Aspergillus nidulans* *hxB* and *Drosophila melanogaster* *ma-l* genes with *nifS* from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor." Mol Microbiol **38**(1): 114-125.
- Andreesen, J. R. and S. Fetzner (2002). "The molybdenum-containing hydroxylases of nicotinate, isonicotinate, and nicotine." Met Ions Biol Syst **39**: 405-430.
- Antal, Z., L. Manczinger, et al. (1997). "Transformation of a mycoparasitic *Trichoderma harzianum* strain with the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*." Biotechnology Techniques **11**(3): 205-208.
- Apostolaki, A., Z. Erpapazoglou, et al. (2009). "AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis." Eukaryot Cell **8**(3): 339-352.
- Arst, H. N., Jr. (1968). "Genetic analysis of the first steps of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*." Nature **219**(5151): 268-270.
- Arst, H. N., Jr. and D. J. Cove (1973). "Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*." Mol Gen Genet **126**(2): 111-141.
- Arts, G. J., M. Fornerod, et al. (1998). "Identification of a nuclear export receptor for tRNA." Curr Biol **8**(6): 305-314.
- Badawy, A. A. (2014). "Pellagra and alcoholism: a biochemical perspective." Alcohol Alcohol **49**(3): 238-250.
- Bal, J., E. M. Kajtaniak, et al. (1977). "4-nitroquinoline-1-oxide: A good mutagen for *Aspergillus nidulans*." Mutat Res-Fundam Mol Mech Mut **56**(2): 153-156.
- Berger, H., R. Pachlinger, et al. (2006). "The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA." Mol Microbiol **59**(2): 433-446.
- Bernreiter, A., A. Ramon, et al. (2007). "Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*." Mol Cell Biol **27**(3): 791-802.
- Berry, D. F., A. J. Francis, et al. (1987). "Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions." Microbiol Rev **51**(1): 43-59.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

- Breithaupt, C., R. Kurzbauer, et al. (2006). "Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: self-inhibition by dimerization." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14337-14342.
- Bun-Ya, M., M. Nishimura, et al. (1991). "The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter." Mol Cell Biol **11**(6): 3229-3238.
- Caddick, M. X., D. Peters, et al. (1994). "Nitrogen regulation in fungi." Antonie Van Leeuwenhoek **65**(3): 169-177.
- Cammack, R., T. Atwood, et al. (2006). Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology, Oxford University Press.
- Cecchetto, G., M. Richero, et al. (2012). "Mutations in the basic loop of the Zn binuclear cluster of the UaY transcriptional activator suppress mutations in the dimerisation domain." Fungal Genet Biol **49**(9): 731-743.
- Chan, C. K., S. Hubner, et al. (1998). "Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery." Gene Ther **5**(9): 1204-1212.
- Chaveroche, M. K., J. M. Ghigo, et al. (2000). "A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*." Nucleic Acids Res **28**(22): E97.
- Chook, Y. M. and G. Blobel (2001). "Karyopherins and nuclear import." Curr Opin Struct Biol **11**(6): 703-715.
- Clutterbuck, A. J. (1972). "Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*." J Gen Microbiol **70**(3): 423-435.
- Cooper, Ed. (2000). Regulation of Transcription in Eukaryotes. Sunderland (MA), The Cell: A Molecular Approach.
- Coughlan, M. P., R. K. Mehra, et al. (1984). "Optical and electron paramagnetic resonance spectroscopic studies on purine hydroxylase II from *Aspergillus nidulans*." Arch Biochem Biophys **229**(2): 596-603.
- Cove, D. J. (1966). "The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*." Biochim Biophys Acta **113**(1): 51-56.
- Cultrone, A., Y. R. Dominguez, et al. (2007). "The tightly regulated promoter of the *xanA* gene of *Aspergillus nidulans* is included in a helitron." Mol Microbiol **63**(6): 1577-1587.
- Cultrone, A., C. Scazzocchio, et al. (2005). "Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases." Mol Microbiol **57**(1): 276-290.
- Darlington, A. J. and C. Scazzocchio (1968). "Evidence for an alternative pathway of xanthine oxidation in *Aspergillus nidulans*." Biochim Biophys Acta **166**(2): 569-571.
- Denison, S. H. and G. S. May (1994). "Mitotic catastrophe is the mechanism of lethality for mutations that confer mutagen sensitivity in *Aspergillus nidulans*." Mutat Res **304**(2): 193-202.
- Dickmanns, A., R. H. Kehlenbach, et al. (2015). "Nuclear Pore Complexes and Nucleocytoplasmic Transport: From Structure to Function to Disease." Int Rev Cell Mol Biol **320**: 171-233.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Res **32**(5): 1792-1797.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, et al. (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." J Mol Biol **300**(4): 1005-1016.
- Enenkel, C., G. Blobel, et al. (1995). "Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes." J Biol Chem **270**(28): 16499-16502.

- Enroth, C., B. T. Eger, et al. (2000). "Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10723-10728.
- Ferenczy, L., F. Kevei, et al. (1975). "Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts." Experientia **31**(1): 50-52.
- Fisher, R. F., A. Das, et al. (1985). "Analysis of the requirements for transcription pausing in the tryptophan operon." J Mol Biol **182**(3): 397-409.
- Flick, K. M., N. Spielewoy, et al. (2003). "Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters." Mol Biol Cell **14**(8): 3230-3241.
- Fried, H. and U. Kutay (2003). "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1659-1688.
- Galanopoulou, K., C. Scazzocchio, et al. (2014). "Purine utilization proteins in the Eurotiales: cellular compartmentalization, phylogenetic conservation and divergence." Fungal Genet Biol **69**: 96-108.
- Garattini, E., M. Fratelli, et al. (2008). "Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry." Cell Mol Life Sci **65**(7-8): 1019-1048.
- Ghosh, H. S., M. McBurney, et al. (2010). "SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin." PLoS One **5**(2): e9199.
- Glatigny, A., P. Hof, et al. (1998). "Altered specificity mutations define residues essential for substrate positioning in xanthine dehydrogenase." J Mol Biol **278**(2): 431-438.
- Glatigny, A. and C. Scazzocchio (1995). "Cloning and molecular characterization of *hxA*, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*." J Biol Chem **270**(8): 3534-3550.
- Goldman, G. H. and E. Kafer (2004). "*Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes." Fungal Genet Biol **41**(4): 428-442.
- Gomez, D., B. Cubero, et al. (2002). "PrnA, a Zn₂Cys₆ activator with a unique DNA recognition mode, requires inducer for *in vivo* binding." Mol Microbiol **44**(2): 585-597.
- Gorlich, D., M. Dabrowski, et al. (1997). "A novel class of RanGTP binding proteins." J Cell Biol **138**(1): 65-80.
- Gorlich, D. and U. Kutay (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 607-660.
- Gournas, C., N. Oestreicher, et al. (2011). "Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*." Fungal Genet Biol **48**(8): 840-848.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-2723.
- Gugnani, H. C. (2003). "Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli." Front Biosci **8**: s346-357.
- Hamari, Z., S. Amillis, et al. (2009). "Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **73**(1): 43-57.
- Hanselman (1985). Studies on the expression of the purine hydroxylase genes of *Aspergillus nidulans*. Essex, University of Essex.
- Hashimoto, T., T. Perlot, et al. (2012). "ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation." Nature **487**(7408): 477-481.
- He, X., S. Li, et al. (2018). "Overexpression of *Aspergillus nidulans* alpha-1,3-glucan synthase increases cellular adhesion and causes cell wall defects." Med Mycol **56**(5): 645-648.

- Henderson, B. R. and A. Eleftheriou (2000). "A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals." Exp Cell Res **256**(1): 213-224.
- Hille, R. (2005). "Molybdenum-containing hydroxylases." Arch Biochem Biophys **433**(1): 107-116.
- Horton, P., K. J. Park, et al. (2007). "WoLF PSORT: protein localization predictor." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W585-587.
- Humphrey, W., A. Dalke, et al. (1996). "VMD: visual molecular dynamics." J Mol Graph **14**(1): 33-38, 27-38.
- Ijichi, H., A. Ichiyama, et al. (1966). "Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. 3. Comparative in vivo studies on nicotinic acid, nicotinamide, and quinolinic acid as precursors of nicotinamide adenine dinucleotide." J Biol Chem **241**(16): 3701-3707.
- Ikeda, M., H. Tsuji, et al. (1965). "Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide. II. A Role of Picolinic Carboxylase in the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide from Tryptophan in Mammals." J Biol Chem **240**: 1395-1401.
- Ishikita, H., B. T. Eger, et al. (2012). "Protein conformational gating of enzymatic activity in xanthine oxidoreductase." J Am Chem Soc **134**(2): 999-1009.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." J Mol Biol **3**: 318-356.
- Jaivel, M. (2010). "Optimization of lovastatin production in solid state fermentation by *Aspergillus terreus*." International Journal of Engineering Science and Technology **2**(7): 2730-2733.
- Jakel, S. and D. Gorlich (1998). "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells." EMBO J **17**(15): 4491-4502.
- Jerald C. Ensigns, S. R. (1964). "The Pathway of Nicotinic Acid Oxidation by a *Bacillus* Species." The Journal of Biological Chemistry **239**(7): 2285-2291.
- Jimenez, J. I., A. Canales, et al. (2008). "Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(32): 11329-11334.
- Jin, F. J., T. Takahashi, et al. (2011). "SclR, a basic helix-loop-helix transcription factor, regulates hyphal morphology and promotes sclerotial formation in *Aspergillus oryzae*." Eukaryot Cell **10**(7): 945-955.
- Johnson-Saliba, M., N. A. Siddon, et al. (2000). "Distinct importin recognition properties of histones and chromatin assembly factors." FEBS Lett **467**(2-3): 169-174.
- Kafer, E. (1965). "Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*." Genetics **52**(1): 217-232.
- Karacsony, Z., A. Gacser, et al. (2014). "A dually located multi-HMG-box protein of *Aspergillus nidulans* has a crucial role in conidial and ascospore germination." Mol Microbiol **94**(2): 383-402.
- Keresztesy, J. C. (1944). "The water-soluble vitamins." Annual Review of Biochemistry **13**: 367-410.
- Kevei, F. and J. F. Peberdy (1977). "Interspecific Hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by Fusion of Somatic Protoplasts." Journal of General Microbiology **102**(Oct): 255-262.
- Kevei, K., Ed. (2010). Mikrobiológia I. Szeged, JatePress.
- King, B. R. and C. Guda (2007). "ngLOC: an n-gram-based Bayesian method for estimating the subcellular proteomes of eukaryotes." Genome Biol **8**(5): R68.

- Kosugi, S., M. Hasebe, et al. (2009). "Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(25): 10171-10176.
- Kren, A., Y. M. Mamnun, et al. (2003). "War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast." Mol Cell Biol **23**(5): 1775-1785.
- Kudla, B., M. X. Caddick, et al. (1990). "The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger." EMBO J **9**(5): 1355-1364.
- Kumar, J. S., V. S. Subramanian, et al. (2013). "Mammalian colonocytes possess a carrier-mediated mechanism for uptake of vitamin B3 (niacin): studies utilizing human and mouse colonic preparations." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **305**(3): G207-213.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Laity, J. H., B. M. Lee, et al. (2001). "Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity." Curr Opin Struct Biol **11**(1): 39-46.
- Larionov, A., A. Krause, et al. (2005). "A standard curve based method for relative real time PCR data processing." BMC Bioinformatics **6**: 62.
- Larochelle, M., S. Drouin, et al. (2006). "Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production." Mol Cell Biol **26**(17): 6690-6701.
- Lewis, N. J., P. Hurt, et al. (1978). "The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. IV. A comparison between purine hydroxylase I and II." Eur J Biochem **91**(1): 311-316.
- Lewis, N. J. and C. Scazzocchio (1977). "The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. A xanthine dehydrogenase I half-molecule in *cnx*- mutant strains of *Aspergillus nidulans*." Eur J Biochem **76**(2): 441-446.
- Li, W., T. Zhang, et al. (2015). "Molecular basis for the substrate specificity and catalytic mechanism of thymine-7-hydroxylase in fungi." Nucleic Acids Res **43**(20): 10026-10038.
- Liu, T. D. and G. A. Marzluf (2004). "Characterization of *pco-1*, a newly identified gene which regulates purine catabolism in *Neurospora*." Curr Genet **46**(4): 213-227.
- Llorente, B. and B. Dujon (2000). "Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DAL5 gene family and identification of the high affinity nicotinic acid permease TNA1 (YGR260w)." FEBS Lett **475**(3): 237-241.
- Lockington, R., C. Scazzocchio, et al. (1987). "Regulation of *alcR*, the positive regulatory gene of the ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **1**(3): 275-281.
- Lohr, D., P. Venkov, et al. (1995). "Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network." FASEB J **9**(9): 777-787.
- MacPherson, S., M. Larochelle, et al. (2006). "A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins." Microbiol Mol Biol Rev **70**(3): 583-604.
- Mahro, M., N. F. Bras, et al. (2013). "Identification of crucial amino acids in mouse aldehyde oxidase 3 that determine substrate specificity." PLoS One **8**(12): e82285.
- Matheny, C., M. L. Day, et al. (1994). "The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain." J Biol Chem **269**(11): 8176-8181.
- Matthias Nagel, J. R. A. (1990). "Purification and characterization of the molybdoenzymes nicotinate dehydrogenase and 6-hydroxynicotinate dehydrogenase from *Bacillus niacini*." Archives of Microbiology **154**(6): 605-613.

- Mayorga, M. E. and W. E. Timberlake (1992). "The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* wA gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases." Mol Gen Genet **235**(2-3): 205-212.
- Mehra, R. K. and M. P. Coughlan (1989). "Characterization of purine hydroxylase I from *Aspergillus nidulans*." J Gen Microbiol **135**(Pt 2): 273-278.
- Mendel, R. R. and F. Bittner (2006). "Cell biology of molybdenum." Biochim Biophys Acta **1763**(7): 621-635.
- Morozov, I. Y., M. G. Jones, et al. (2010). "Distinct roles for Caf1, Ccr4, Edc3 and CutA in the co-ordination of transcript deadenylation, decapping and P-body formation in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **76**(2): 503-516.
- Morris, N. R. and A. P. Enos (1992). "Mitotic gold in a mold: *Aspergillus* genetics and the biology of mitosis." Trends Genet **8**(1): 32-37.
- Muro-Pastor, M. I., R. Gonzalez, et al. (1999). "The GATA factor AreA is essential for chromatin remodelling in a eukaryotic bidirectional promoter." EMBO J **18**(6): 1584-1597.
- Nakano, H., M. Wieser, et al. (1999). "Purification, characterization and gene cloning of 6-hydroxynicotinate 3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* TN5." Eur J Biochem **260**(1): 120-126.
- Nakielnny, S. and G. Dreyfuss (1999). "Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus." Cell **99**(7): 677-690.
- Narendja, F., S. P. Goller, et al. (2002). "Nitrate and the GATA factor AreA are necessary for in vivo binding of NirA, the pathway-specific transcriptional activator of *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **44**(2): 573-583.
- Nayak, T., H. Edgerton-Morgan, et al. (2010). "Gamma-tubulin regulates the anaphase-promoting complex/cyclosome during interphase." J Cell Biol **190**(3): 317-330.
- Nayak, T., E. Szewczyk, et al. (2006). "A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*." Genetics **172**(3): 1557-1566.
- Nikolaev, I., M. F. Cochet, et al. (2003). "Nuclear import of zinc binuclear cluster proteins proceeds through multiple, overlapping transport pathways." Eukaryot Cell **2**(2): 209-221.
- Oestreicher, N. and C. Scazzocchio (1995). "A single amino acid change in a pathway-specific transcription factor results in differing degrees of constitutivity, hyperinducibility and derepression of several structural genes." J Mol Biol **249**(4): 693-699.
- Okamoto, K., T. Kusano, et al. (2013). "Chemical nature and reaction mechanisms of the molybdenum cofactor of xanthine oxidoreductase." Curr Pharm Des **19**(14): 2606-2614.
- Osmani, S. A. and P. M. Mirabito (2004). "The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*." Fungal Genet Biol **41**(4): 401-410.
- Palmeri, D. and M. H. Malim (1999). "Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha." Mol Cell Biol **19**(2): 1218-1225.
- Pansuriya, R. C. and R. S. Singhal (2010). "Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation." Braz J Microbiol **41**(1): 164-172.
- Pateman, J. A., D. J. Cove, et al. (1964). "A Common Co-Factor for Nitrate Reductase and Xanthine Dehydrogenase Which Also Regulates the Synthesis of Nitrate Reductase." Nature **201**: 58-60.

- Platt, A., A. Ravagnani, et al. (1996). "Mutational analysis of the C-terminal region of AREA, the transcription factor mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*." Mol Gen Genet **250**(1): 106-114.
- Pokorska, A., C. Drevet, et al. (2000). "The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localisation sequence." J Mol Biol **298**(4): 585-596.
- Pontecorvo, G., J. A. Roper, et al. (1953). "The genetics of *Aspergillus nidulans*." Adv Genet **5**: 141-238.
- Prade, R. A., J. Griffith, et al. (1997). "In vitro reconstruction of the *Aspergillus* (= *Emericella*) *nidulans* genome." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14564-14569.
- Punt, P. J., R. P. Oliver, et al. (1987). "Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*." Gene **56**(1): 117-124.
- Punt, P. J., J. Strauss, et al. (1995). "The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally." Mol Cell Biol **15**(10): 5688-5699.
- Reichelt, R., A. Holzenburg, et al. (1990). "Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components." J Cell Biol **110**(4): 883-894.
- Ribbeck, K., G. Lipowsky, et al. (1998). "NTF2 mediates nuclear import of Ran." EMBO J **17**(22): 6587-6598.
- Robellet, X., N. Oestreicher, et al. (2010). "Gene silencing of transgenes inserted in the *Aspergillus nidulans* *alcM* and/or *alcS* loci." Curr Genet **56**(4): 341-348.
- Roberts, E., J. Eargle, et al. (2006). "MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis." BMC Bioinformatics **7**: 382.
- Roy, A., A. Kucukural, et al. (2010). "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction." Nat Protoc **5**(4): 725-738.
- Said, H. M. (2011). "Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease." Biochem J **437**(3): 357-372.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scazzocchio, C. (1973). "The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. II. Use of NADH dehydrogenase activity associated with xanthine dehydrogenase to investigate substrate and product inductions." Mol Gen Genet **125**(2): 147-155.
- Scazzocchio, C., Ed. (1980). The Genetics of the Molybdenum-containing Enzymes. Molybdenum and Molybdenum-Containing Enzymes Oxford:, Pergamon Press.
- Scazzocchio, C. (1994). "The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation." Prog Ind Microbiol **29**: 221-257.
- Scazzocchio, C. (2000). "The fungal GATA factors." Curr Opin Microbiol **3**(2): 126-131.
- Scazzocchio, C., F. B. Holl, et al. (1973). "The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Allopurinol-resistant mutants constitutive for xanthine-dehydrogenase." Eur J Biochem **36**(2): 428-445.
- Scazzocchio, C., N. Sdrin, et al. (1982). "Positive regulation in a eukaryote, a study of the *uaY* gene of *Aspergillus nidulans*: I. Characterization of alleles, dominance and complementation studies, and a fine structure map of the *uaY*--*oxpA* cluster." Genetics **100**(2): 185-208.
- Schjerling, P. and S. Holmberg (1996). "Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators." Nucleic Acids Res **24**(23): 4599-4607.
- Schleif, R. (2010). "AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action." FEMS Microbiol Rev **34**(5): 779-796.

- Schluter, A., A. Real-Chicharro, et al. (2010). "PeroxisomeDB 2.0: an integrative view of the global peroxisomal metabolome." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D800-805.
- Schmid, A., et al., Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001. 409(6817): p. 258-68
- Schroeder, H. W. and W. H. Kelton (1975). "Production of sterigmatocystin by some species of the genus *Aspergillus* and its toxicity to chicken embryos." Appl Microbiol **30**(4): 589-591.
- Sealy-Lewis, H. M., D. Lycan, et al. (1979). "Product induction of purine hydroxylase II in *Aspergillus nidulans*." Mol Gen Genet **174**(1): 105-106.
- Sealy-Lewis, H. M., C. Scazzocchio, et al. (1978). "A mutation defective in the xanthine alternative pathway of *Aspergillus nidulans*: its use to investigate the specificity of *uaY* mediated induction." Mol Gen Genet **164**(3): 303-308.
- Seedorf, M., M. Damelin, et al. (1999). "Interactions between a nuclear transporter and a subset of nuclear pore complex proteins depend on Ran GTPase." Mol Cell Biol **19**(2): 1547-1557.
- Sellick, C. A. and R. J. Reece (2003). "Modulation of transcription factor function by an amino acid: activation of Put3p by proline." EMBO J **22**(19): 5147-5153.
- Sezonov, G., D. Joseleau-Petit, et al. (2007). "*Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth." J Bacteriol **189**(23): 8746-8749.
- Shimizu, K., J. K. Hicks, et al. (2003). "Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)2Cys6 transcription factor in *Aspergillus nidulans*." Genetics **165**(3): 1095-1104.
- Suarez, T., M. V. de Queiroz, et al. (1995). "The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **14**(7): 1453-1467.
- Truglio, J. J., K. Theis, et al. (2002). "Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*." Structure **10**(1): 115-125.
- Turpin, P., B. Ossareh-Nazari, et al. (1999). "Nuclear transport and transcriptional regulation." FEBS Lett **452**(1-2): 82-86.
- Ueda M., Sashida R. (1998) Microbial production of 2-hydroxynicotinic acid from nicotinic acid by intact cells of MCI3289. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* Volume 4(4): 199–204
- Urnov, F. D. (2002). "A feel for the template: zinc finger protein transcription factors and chromatin." Biochem Cell Biol **80**(3): 321-333.
- Vandromme, M., C. Gauthier-Rouviere, et al. (1996). "Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression." Trends Biochem Sci **21**(2): 59-64.
- Wang, H., Y. Lei, et al. (2016). "Comparative transcript profiling of resistant and susceptible peanut post-harvest seeds in response to aflatoxin production by *Aspergillus flavus*." BMC Plant Biol **16**: 54.
- Ward, O. P., W. M. Qin, et al. (2005). "Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*." Adv Appl Microbiol **58C**: 1-75.
- Wilson, R. A. and H. N. Arst, Jr. (1998). "Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the "streetwise" GATA family of transcription factors." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 586-596.
- Xu, X. J. and G. S. Jiang (2015). "Niacin-respondent subset of schizophrenia - a therapeutic review." Eur Rev Med Pharmacol Sci **19**(6): 988-997.

- Yang, Y., S. Yuan, et al. (2009). "Cloning, heterologous expression, and functional characterization of the nicotinate dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida* KT2440." Biodegradation **20**(4): 541-549.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, et al. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**(1): 103-119.
- Yu, J. H., Z. Hamari, et al. (2004). "Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi." Fungal Genet Biol **41**(11): 973-981.
- Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." BMC Bioinformatics **9**: 40.
- Zhang, Y., X. Gao, et al. (2017). "Microtubule-organizing centers of *Aspergillus nidulans* are anchored at septa by a disordered protein." Mol Microbiol **106**(2): 285-303.

11. Mellékletek

1.melléklet

Alkalmazott *Aspergillus nidulans* törzsek

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
A148	<i>pabaA1 wA3 veA1</i>	növekedési teszt	Herb Arst gyűjteményéből
AJ.1	$\Delta hxnR::zeo$ <i>hhoA-mRFP-AfriboB+ pantoB100 veA1</i> a pAN-HZS-7 plazmidot 4 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat; fluoreszcens mikroszkópia	jelen munka (készült a <i>gpd</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-7 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
AJ.2	$\Delta hxnR::zeo$ <i>hhoA-mRFP-AfriboB+ pantoB100 veA1</i> a pAN-HZS-7 plazmidot 10 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat; fluoreszcens mikroszkópia	jelen munka (készült a <i>gpd</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-7 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
AJ.3	$\Delta hxnR::zeo$; <i>hhoA-mRFP-Afribo+</i> , <i>prnD</i> , <i>pantoB100 veA1</i> , a pAN-HZS-6 plazmidot 1 kópiában hordozza (ektopikus integráció)	fluoreszcens mikroszkópia, növekedési teszt; RT-PCRt	jelen munka (készült a <i>PrnD</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-6 plazmid HZS.543 törzsbe transzformálásával)
AJ.4	$\Delta hxnR::zeo$; <i>hhoA-mRFP-Afribo+</i> , <i>prnD</i> , <i>pantoB100 veA1</i> , a pAN-HZS-6 plazmidot 4 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>PrnD</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-6 plazmid HZS.543 törzsbe transzformálásával)
AJ.5	$\Delta hxnR::zeo$; <i>hhoA-mRFP-Afribo+</i> , <i>prnD</i> , <i>pantoB100 veA1</i> , a pAN-HZS-6 plazmidot 5 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>PrnD</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-6 plazmid HZS.543 törzsbe transzformálásával)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
AJ.6	<i>hhoA-mRFP-AfriboB⁺</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>nkuAΔ::argB⁺</i> + a <i>hxnR-gfp</i> lókuszt intergrációját biztosító plazmid 1 kópiában	növekedési teszt; RT-PCR	jelen munka (készült a <i>hxnR-gfp-Afu_riboB⁺</i> -down <i>hxnR</i> plazmid LO1516 törzsbe transzformálásával)
AJ.7	<i>hhoA-mRFP-AfriboB⁺</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i> + <i>gfp-hxnR</i> plazmid 2 kópiában (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>gfp-hxnR</i> 5 komponensű kazetta (cirkuláris plazmid) HZS.622 törzsbe transzformálásával)
AJ.8	<i>hhoA-mRFP-AfriboB⁺</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i> <i>gfp-hxnR</i> plazmidot 3 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt; fluoreszcens mikroszkópia	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>gfp-hxnR</i> 5 komponensű kazetta (cirkuláris plazmid) HZS.622 törzsbe transzformálásával)
AJ.9	<i>hhoA-mCh-AfpYrG</i> <i>hxnRΔ::AfriboB⁺</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i> <i>gfp-hxnR</i> lineáris kazettát 1 kópiában hordozza	növekedési teszt; fluoreszcens mikroszkópia	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>gfp-hxnR</i> 5 komponensű kazetta (lineáris) HZS.668 törzsbe transzformálásával)
AJ.10	<i>hhoA-mCh-AfpYrG</i> <i>hxnRΔ::AfriboB⁺</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i> <i>gfp-hxnR</i> lineáris kazettát 2 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>gfp-hxnR</i> 5 komponensű kazetta (lineáris) HZS.668 törzsbe transzformálásával)
AJ.11	<i>hhoA-mCh-AfpYrG</i> <i>hxnRΔ::AfriboB⁺</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i> <i>gfp-hxnR</i> lineáris kazettát 3 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>gfp-hxnR</i> 5 komponensű kazetta (lineáris) HZS.668 törzsbe transzformálásával (trf16))

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
AJ.12	<i>hhoA-mCh-Afp_{yrG}</i> <i>hxnRΔ::AfriboB+</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i> <i>gfp-hxnR</i> lineáris kazattát 3 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>gfp</i> - <i>hxnR</i> 5 komponensű kazetta (lineáris) HZS.668 törzsbe transzformálásával (trf 26)
AJ.13	<i>hhoA-mCh-Afp_{yrG}</i> <i>hxnRΔ::AfriboB+</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i> <i>gfp-hxnR</i> lineáris kazattát 4 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>gfp</i> - <i>hxnR</i> 5 komponensű kazetta (lineáris) HZS.668 törzsbe transzformálásával
AJ.14	<i>hhoA-mCh-Afp_{yrG}</i> <i>hxnRΔ::AfriboB+</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i> <i>gfp-hxnR</i> lineáris kazattát 5 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt; fluoreszcens mikroszkópia	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>gfp</i> - <i>hxnR</i> 5 komponensű kazetta (lineáris) HZS.668 törzsbe transzformálásával
AJ.15	<i>hhoA-mCh-Afp_{yrG}</i> <i>hxnRΔ::AfriboB+ pyroA4</i> <i>veA1</i> + 1 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR-t</i> tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.668 törzsbe transzformálásával (<i>hxnR</i> rekonstitúciós transzformáns 2)
AJ.16	<i>hhoA-mCh-Afp_{yrG}</i> <i>hxnRΔ::AfriboB+ pyroA4</i> <i>veA1</i> + 1 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR-t</i> tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.668 törzsbe transzformálásával (<i>hxnR</i> rekonstitúciós transzformáns 5)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
AJ.17	<i>hhoA-mCh-Afp_{yrG}</i> <i>hxnRΔ::AfriboB+ pyroA4</i> <i>veA1</i> + 1 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR-t</i> tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.668 törzsbe transzformálásával (<i>hxnR</i> rekonstitúciós transzformáns 6)
AJ.18	<i>hhoA-mCh-Afp_{yrG}</i> <i>hxnRΔ::AfriboB+ pyroA4</i> <i>veA1</i> + 2 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR-t</i> tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.668 törzsbe transzformálásával (<i>hxnR</i> rekonstitúciós transzformáns)
AJ.19	<i>hxnRΔ::zeo veA1</i> + 1 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt;	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR-t</i> tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.136 törzsbe transzformálásával
AJ.20	<i>hxnRΔ::zeo veA1</i> + 2 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR-t</i> tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.136 törzsbe transzformálásával
AJ.21	<i>hxnRΔ::zeo veA1</i> + 4 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR-t</i> tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.136 törzsbe transzformálásával
AJ.22	<i>hxnRΔ::zeo veA1</i> + 5 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR-t</i> tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.136 törzsbe transzformálásával

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
AJ.23	<i>hxnRA::zeo veA1</i> + 9 kópiában a <i>hxnR</i> promóter- <i>hxnR-hxnR</i> terminációs régió (ektopikus integrációk)	növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>uphxnR-hxnR-down-hxnR</i> -t tartalmazó pAN-HZS-1 plazmid HZS.136 törzsbe transzformálásával
CS1132	<i>hxA18 biA1 veA1</i>	szülői törzs a HZS.98 kereszteléséhez	(Cultrone, Scazzocchio és mtsai., 2005)
CS2638	<i>yA2 pantoB100 riboB2</i> <i>nicB8 fpaD43 acet⁻ veA1</i>	szülői törzs a HZS.221 és HZS.226 kereszteléséhez	jelen munka
CS302	<i>wA4, pabaA1, hxnR2</i>	<i>hxnR</i> modellezés	C.Schazocchio gyűjteményéből
CS302.2	<i>wA4 pabaA1 hxnR3</i>	<i>hxnR</i> modellezés	C.Schazocchio gyűjteményéből
CS3095	<i>areA600 biA1 sb43 veA1</i>	RT-PCR	(Kudla, Caddick és mtsai., 1990)
CS51.2	<i>hxnR^c48 biA1</i>	<i>hxnR</i> modellezés	C.Schazocchio gyűjteményéből
FGSCA26	<i>biA1 veA1</i>	RT-PCR	(Kafer, 1965)
FGSCA872/ CS51	<i>hxnR^c7 biA1 veA1</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	(Scazzocchio, Holl és mtsai., 1973)
HZS. 350	<i>hhoA-mRFP-AfriboB pyroA4</i> <i>pyrG89 riboB2 nkuA-</i> <i>delta::argB+</i>	szülői törzs HZS.136 kereszteléséhez	(Nayak és mtsai., 2010)
HZS.106	<i>hxnSΔ::zeo hxAΔ::zeo</i> <i>pyrG89 pantoB100 biA1</i> <i>veA1 pyr4 in trans</i>	növekedési teszt; RT- PCR; szülői törzs a HZS.122 létrehozásához	jelen munka
HZS.109	<i>hxnS41 hxnR^c7 biA1 wA3</i> <i>veA1</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	C.Schazocchio gyűjteményéből
HZS.110	<i>hxnS35 hxnR^c7 biA1 wA3</i> <i>veA1</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	C.Schazocchio gyűjteményéből
HZS.113	<i>hxnS29 pyrG89 (hxnR^c7)</i> <i>pantoB100 biA1 veA1</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	C.Schazocchio gyűjteményéből

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.120	<i>riboB2 pabaA1 veA1</i>	befogadó törzs transzformációs kísérletben a deléció <i>hxnT</i> és <i>hxnY</i> törzsek létrehozásához	(Hamari, Amillis és mtsai., 2009)
HZS.122	<i>riboB2 pabaA1 yA2 veA1</i>	szülői törzs a HZS.106 kereszteléséhez	jelen munka
HZS.123	<i>anA1; riboB2; pabaA1, veA1</i>	befogadó törzs transzformációs kísérletben a deléció <i>hxnS</i> törzs létrehozásához	jelen munka
HZS.135	<i>hxB20 biA1 veA1</i>	RT-PCR	C.Schazocchio gyűjteményéből
HZS.136	<i>hxnRA::zeo pantoB100 veA1</i>	szülői törzs a LO1516 kereszteléséhez; növekedési teszt; RT- PCR; befogadó törzs transzformációs kísérletben (<i>hxnR</i> rekonstitúció)	jelen munka
HZS.145	<i>veA1</i>	növekedési teszt; RT- PCR, enzim aktivitás vizsgálatok	jelen munka
HZS.215	<i>pantoB100, yA2, veA1</i>	szülői törzs LOL1516 kereszteléséhez	Robellet és mtsai., 2010
HZS.216	<i>xprD1 biA1 pabaA1 veA1</i>	RT-PCR	(Kudla, Caddick és mtsai., 1990),
HZS.220	<i>hxnPA::riboB⁺ riboB2</i> <i>hxnR80 pyroA4</i> <i>nkuAA::argB⁺ veA1</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült az "uphxnP-riboB ⁺ -downhxnP" szubsztitúciós kazetta TNO2 A21-be transzformálásával)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.221	<i>hxnPΔ::riboB⁺ riboB2 pyroA4 nkuAΔ::argB⁺ veA1</i>	növekedési teszt, szülői törzs a HZS.399 és a CS2638 keresztezéséhez	jelen munka (készült az "uphxnP-riboB ⁺ -downhxnP" szubsztitúciós kazetta TNO2 A21 törzsbe transzformálásával)
HZS.222	<i>hxnTΔ::pabaA⁺ pabaA1 riboB2 veA1</i>	növekedési teszt, szülői törzs a HZS.397 keresztezéséhez	jelen munka (készült az "uphxnT-pabaA ⁺ -downhxnT" szubsztitúciós kazetta HZS.120 törzsbe transzformálásával)
HZS.223	<i>hxnYΔ::riboB⁺ riboB2 pabaA1 veA1</i>	növekedési teszt, szülői törzs a HZS.395 keresztezéséhez	jelen munka (készült az "uphxnY-riboB ⁺ -downhxnY" szubsztitúciós kazetta HZS.120 törzsbe transzformálásával)
HZS.226	<i>hxnZΔ::riboB⁺ riboB2 pyroA4 nkuAΔ::argB⁺ veA1</i>	növekedési teszt, szülői törzs a HZS.399 és a CS2638 keresztezéséhez	jelen munka (készült az "uphxnZ-riboB ⁺ -downhxnZ" szubsztitúciós kazetta TNO2 A21 törzsbe transzformálásával)
HZS.245	<i>hxAA::zeo riboB2 pantoB100 biA1 veA1</i>	enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.106 és HZS.122 törzsek keresztezésével)
HZS.248	<i>hxAA::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1</i>	UV és 4-nitroquinolin 1-oxid mutagenesishez használt törzs	jelen munka (készült a HZS.106 és HZS.122 törzsek keresztezésével)
HZS.254	<i>hxnSΔ::zeo biA1 veA1</i>	növekedési teszt	jelen munka (készült a HZS.106 és HZS.122 törzsek keresztezésével)
HZS.354	<i>hxAA::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c100</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.355	<i>hxAA::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c101</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.395	<i>hxnR^c7 riboB2 biA1 veA1</i>	szülői törzs a HZS.223 keresztezéséhez	jelen munka
HZS.397	<i>hxnR^c7 pabaA1 anA1 veA1</i>	szülői törzs a HZS.222 keresztezéséhez	jelen munka
HZS.399	<i>hxnR^c7 riboB2 pabaA1 veA1</i>	szülői törzs a HZS.221 és a HZS.226 keresztezéséhez	jelen munka
HZS.405	<i>hxAΔ::zeo hxnR^c7 pyroA4 pabaA1 yA2 veA1</i>	növekedési teszt és enzim aktivitás vizsgálatok kontroll törzse	jelen munka
HZS.416	<i>hxnRΔ::zeo hhoA-mRFP-AfriboB⁺ pantoB100 (nkuAΔ::argB⁺) veA1</i>	befogadó törzs transzformációs kísérletben a <i>hxnR-gfp</i> fúziós konstrukciót hordozó törzs létrehozásához	jelen munka (készült a HZS.136 és LOL1516 törzsek keresztezésével)
HZS.417	<i>hxnRΔ::zeo hhoA-mRFP-AfriboB⁺ pantoB100 (nkuAΔ::argB⁺) veA1</i> , a pAN-HZS-6 plazmidot 20 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	fluoreszcens mikroszkópia, növekedési teszt	jelen munka (készült a <i>PrnD</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-6 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.418	<i>hxA18 pantoB100 veA1</i>	UV mutagenézishez használt törzs	jelen munka (készült a HZS.98 és CS1132 törzsek keresztezésével)
HZS.422	<i>hxnRΔ::zeo hhoA-mRFP-AfriboB⁺ pantoB100 (nkuAΔ::argB⁺) veA1</i> , a pAN-HZS-6 plazmidot 3 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	fluoreszcens mikroszkópia, növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a <i>PrnD</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-6 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.423	<i>hxnRA::zeo hhoA-mRFP-AfriboB⁺ pantoB100 (nkuAΔ::argB⁺) veA1</i> , a pAN-HZS-6 plazmidot 2 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a <i>PrnD</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-6 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.424	<i>hxnRA::zeo hhoA-mRFP-AfriboB⁺ pantoB100 (nkuAΔ::argB⁺) veA1</i> , a pAN-HZS-6 plazmidot 3 kópiában hordozza (ektopikus integrációk)	növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a <i>PrnD</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-6 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.425	<i>hxnRA::zeo hhoA-mRFP-AfriboB⁺ pantoB100 (nkuAΔ::argB⁺) veA1</i> , a pAN-HZS-6 plazmidot 1 kópiában hordozza (ektopikus integráció)	fluoreszcens mikroszkópia, növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat; RT-PCR	jelen munka (készült a <i>PrnD</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-6 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.427	<i>hxnTA::pabaA⁺ hxnR^{c7} pabaA1 anA1 veA1</i>	enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.222 és HZS.397 törzsek keresztezésével)
HZS.429	<i>hxnYA::riboB⁺ hxnR^{c7} riboB2 pabaA1 biA1 veA1</i>	enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.223 és HZS.395 törzsek keresztezésével)
HZS.452	<i>hxAA::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^{c102}</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.453	<i>hxAA::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^{c103}</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.454	<i>hxAA::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^{c104}</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.455	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c105</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.456	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c106</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.457	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c107</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.458	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c108</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.459	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c109</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.460	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c110</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs UV besugárzásával)
HZS.461	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c150</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs 4-nitroquinolin 1-oxid-dal való mutagenizálásával)
HZS.462	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c151</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs 4-nitroquinolin 1-oxid-dal való mutagenizálásával)
HZS.463	<i>hxAΔ::zeo pantoB100 pabaA1 yA2 veA1 hxnR^c152</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.248 törzs 4- nitroquinoline 1-oxide-dal való mutagenizálásával)
HZS.464	<i>pantoB100 pabaA1 veA1 hxnR^c200</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.98 törzs UV besugárzásával)
HZS.465	<i>pantoB100 pabaA1 veA1 hxnR^c201</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.98 törzs UV besugárzásával)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.466	<i>pantoB100 pabaA1 veA1 hxnR^c202</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.98 törzs UV besugárzásával)
HZS.467	<i>pantoB100 pabaA1 veA1 hxnR^c203</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.98 törzs UV besugárzásával)
HZS.468	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c300</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.469	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c301</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.470	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c302</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.471	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c303</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.472	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c304</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.473	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c305</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.474	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c306</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.475	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c307</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.476	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c308</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.477	<i>hxA18 pantoB100 veA1 hxnR^c309</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.478	<i>hxA18 pantoB100 veA1</i> <i>hxnR^c310</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.479	<i>hxA18 pantoB100 veA1</i> <i>hxnR^c311</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.418 törzs UV besugárzásával)
HZS.480	<i>hxnPA::riboB⁺</i> <i>hxnZA::pyroA⁺ riboB2</i> <i>pyroA4 nkuAΔ::argB⁺ veA1</i>	növekedési teszt	jelen munka
HZS.487	<i>prnD⁻ pabaA1 yA2</i>	szülői törzs HZS.416 kereszteléséhez	Vicky Sophianopoulou gyűjteményéből
HZS.502	<i>hxnTA::pabaA⁺</i> <i>hxnYA::riboB⁺ riboB2</i> <i>pabaA1 veA1</i>	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a HZS.222 és HZS.223 törzsek keresztelésével)
HZS.511	<i>ΔhxnR::zeo hhoA-mRFP-</i> <i>AfriboB+ pantoB100 veA1</i> a pAN-HZS-8 plazmidot 24 kópiában hordozza	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat, fluoreszcens mikroszkópia	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN- HZS-8 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.512	<i>ΔhxnR::zeo hhoA-mRFP-</i> <i>AfriboB+ pantoB100 veA1</i> a pAN-HZS-8 plazmidot 13 kópiában hordozza	növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN- HZS-8 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.513	<i>ΔhxnR::zeo hhoA-mRFP-</i> <i>AfriboB+ pantoB100 veA1</i> a pAN-HZS-8 plazmidot 12 kópiában hordozza	növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN- HZS-8 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.514	<i>ΔhxnR::zeo hhoA-mRFP-</i> <i>AfriboB+ pantoB100 veA1</i> a pAN-HZS-8 plazmidot 11 kópiában hordozza	növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN- HZS-8 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.515	<i>ΔhxnR::zeo hhoA-mRFP-AfriboB+ pantoB100 veA1</i> a pAN-HZS-8 plazmidot 1 kópiában hordozza	növekedési teszt; enzim aktivitás vizsgálat; fluoreszcens mikroszkópia, RT-PCR	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-8 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.516	<i>ΔhxnR::zeo hhoA-mRFP-AfriboB+ pantoB100 veA1</i> a pAN-HZS-8 plazmidot 9 kópiában hordozza	növekedési teszt, enzim aktivitás vizsgálat	jelen munka (készült a <i>hxnR</i> promóter által meghajtott <i>hxnR-gfp</i> -t hordozó pAN-HZS-8 plazmid HZS.416 törzsbe transzformálásával)
HZS.543	<i>ΔhxnR::zeo; hhoA-mRFP-Afribo+, prnD⁻, pantoB100 veA1</i>	befogadó törzs transzformációs kísérletben (<i>hxnR-gfp</i> fúziós konstrukció)	jelen munka (készült a HZS.487 és HZS.416 törzsek keresztezésével)
HZS.568	<i>hxnSTΔ::pabaA+ pabaA1 pyroA4 riboB2 nkuAΔ::argB+ veA1</i>	növekedési teszt	jelen munka
HZS.570	<i>hxnSΔhxnTΔ::pabaA+ pabaA1 ΔhxnY::riboB riboB2 pyroA4 veA1</i>	növekedési teszt	jelen munka
HZS.614	<i>hxnRA::AfuriboB+ riboB2 pyroA4 nkuAΔ::argB veA1</i>	szülői törzs HZS.619 keresztezéséhez	jelen munka (készült az "uphxnR-Af_riboB ⁺ -downhxnR szubsztitúciós kazetta TNO2 A21 törzsbe transzformálásával)
HZS.619	<i>hhoA-mCh-AfPyrG riboB2 pantoB100 veA1</i>	szülői törzs HZS.416 keresztezéséhez	jelen munka (készült a HZS.215 és LOL1516 törzsek keresztezésével)
HZS.622	<i>hhoA-mRFP-AfriboB+ pantoB100 pyroA4 veA1</i>	befogadó törzs transzformációs kísérletben a <i>hxnR-gfp</i> fúziós konstrukciót hordozó törzs létrehozásához	jelen munka (készült a HZS.350 és HZS.215 törzsek keresztezésével)

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
HZS.668	<i>hhoA-mCh-Afp_{pyrG}</i> <i>hxnRΔ::AfriboB⁺</i> <i>pantoB100 pyroA4 veA1</i>	befogadó törzs transzformációs kísérletben (<i>hxnR-gfp</i>) fúziós konstrukció; <i>hxnR</i> rekonstitúció)	jelen munka (készült a HZS. 614 és HZS.619 törzsek keresztezésével)
HZS.98	<i>pantoB100 pabaA1</i>	szülői törzs CS1132 keresztezéséhez; UV mutagenézishez használt törzs	jelen munka
LO1516	<i>hhoA-mRFP-AfriboB⁺</i> ; <i>pyroA4; pyrG89</i> ; <i>nkuAΔ::argB⁺</i>	szülői törzs a HZS.136 és HZS. 215 keresztezéséhez	(Nayak, Edgerton-Morgan és mtsai., 2010)
TNO2 A21	<i>riboB2 pyroA4</i> <i>nkuAΔ::argB⁺ veA1</i>	befogadó törzs transzformációs kísérletben a deléció <i>hxnP</i> , <i>hxnZ</i> és <i>hxnR</i> törzsek létrehozásához	(Nayak, Szewczyk és mtsai., 2006)
HZS.548	<i>hxnSΔ::pabaA⁺ pabaA1</i> <i>anA1 riboB2 veA1</i>	növekedési teszt	jelen munka

A táblázatban feltüntetett *Aspergillus* törzsek genotípusának leírása során alkalmazott, a kísérleteink szempontjából fontosabb jelölések magyarázata:

- *hxA18*: lánc terminációs mutáció a purin hidroxiláz I-et kódoló *hxA* gén 148. kodonjában (Glatigny és Scazzocchio, 1995)
- *hxAΔ::zeo*: nem tartalmazza a *hxA* gént, helyettesítése *zeo* marker génnel történt (Ámon, Fernandez-Martin és mtsai., 2017)
- *nkuAΔ*: az *nkuA* (ATP függő DNS-helikáz) allél deléciója, mely esszenciális azokhoz a dupla szálú DNS töréseket javító mechanizmusokhoz, melyek nem-homológ végek összekapcsolását (Nayak, Szewczyk és mtsai., 2006) végzik. A gén hiánya csökkenti az ektopikus integrációk lehetőségét transzformáció során
- *sb43*: az *sB* szulfát transzporter gén nem funkcionáló allélja (Arst 1968)
- *veA1*: a szexuális fejlődés regulátorának mutáns változata. A VelA regulátor szabályozza a konídium képzését fény jelenlétében és a kleisztotécium képzést fény hiányában (Kafer, 1965)
- *yA2*: *yelA*-ban (para-difenol oxidáz) történt mutáció, következtében sérül a pigmentszintézis, ami sárga konídiumokat eredményez (Clutterbuck, 1972)

- *wA3*: a pigmentszintézisben részt vevő *wA* gén (poliketid-szintáz) mutációja, aminek következtében fehér színű konídiumok képződnek. (Mayorga és Timberlake, 1992)
- *hhoA-mRFP-AfriboB⁺*: monomer piros fluoreszcens fehérje (mRFP) a H1 hiszton génjével (*hhoA*) fúzionáltatva, melyekhez hozzákapcsolták az *Aspergillus fumigatus* vad típusú *riboB⁺* alléljét
- *hhoA-mCh-AfPyrG*: monomer piros fluoreszcens fehérje (mCh) a H1 hiszton génjével (*hhoA*) fúzionáltatva, melyekhez hozzákapcsolták az *Aspergillus fumigatus* vad típusú *pyrG⁺* alléljét
- *hxnR^c*: a *hxnR* gén olyan mutációi, melyek hatására a *hxnR* konstitutívan, indukció nélkül is kifejeződik
- *prnD*: a prolin-oxidáz génben történt mutációra utal, melynek következtében a mikroorganizmus nem képes a prolin nitrogénforrásként való hasznosítására
- *nicB8*: NA bioszintetikus útvonal egyik enzimének mutációja, NA auxotrófiát okoz
- *xprD1*: *areA* allél extrém módon derepresszált változata, ami kis mennyiségű ammónia jelenlétében is ki tud fejeződni
- *areA600*: a nitrogénforrás hasznosítási útvonalak ko-regulátorának (*Area*) mutációja
- az alábbi jelölések auxotrófiákra utalnak: *argB2*: arginin; *biA1*: biotin; *pabaA1*: para- amino-benzoésav; *pantoB100*: pantoténsav; *pyroA4*: piridoxin; *pyrG89*: uracil vagy uridin és *riboB2*: riboflavin

Alkalmazott *Eserichia coli* törzsek

Törzs	Genotípus	Felhasználás	Hivatkozás
JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZAM15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	vektorkonstrukciók felszaporítása	(Cammack, Atwood és mtsai., 2006)
KS272	<i>F⁻ ΔlacX74 galE galK thi rpsL ΔphoA</i>	szubsztitúciós kazetta létrehozása a kétlépéses technikához	(Chaveroche, Ghigo és mtsai., 2000)
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	vektorkonstrukciók felszaporítása	Chan és mtsai., 2013

- Ámon, J., R. Fernandez-Martin, et al. (2017). "A eukaryotic nicotinate-inducible gene cluster: convergent evolution in fungi and bacteria." Open Biol **7**(12).
- Arst, H. N., Jr. (1968). "Genetic analysis of the first steps of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*." Nature **219**(5151): 268-270.
- Cammack, R., T. Atwood, et al. (2006). Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology, Oxford University Press.
- Chan, W. T., C. S. Verma, et al. (2013). "A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*." Biosci Rep **33**(6).
- Chaverroche, M. K., J. M. Ghigo, et al. (2000). "A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*." Nucleic Acids Res **28**(22): E97.
- Clutterbuck, A. J. (1972). "Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*." J Gen Microbiol **70**(3): 423-435.
- Cultrone, A., C. Scazzocchio, et al. (2005). "Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases." Mol Microbiol **57**(1): 276-290.
- Glatigny, A. and C. Scazzocchio (1995). "Cloning and molecular characterization of *hxA*, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*." J Biol Chem **270**(8): 3534-3550.
- Hamari, Z., S. Amillis, et al. (2009). "Convergent evolution and orphan genes in the Fur4p-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **73**(1): 43-57.
- Kafer, E. (1965). "Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*." Genetics **52**(1): 217-232.

2. melléklet

A *hxn* gének deletálására és a *hxnR* gén rekonstruálására szolgáló szubsztitúciós kazetták elkészítéséhez alkalmazott primer szekvenciák

<i>hxnP</i> delécio	
"A" komponens: 2435 bp	
<i>hxnP</i> upst frw	5'-caccgagctgtagctcacctgcttgatg-3'
<i>hxnP</i> upst rev	5'-gtggagattataaacggttctgtttgg-3'
"B" komponens: 2264 bp	
<i>hxnP</i> ribo chim frw	5'-ccaaacagaaccgttataaatctccaccgtacgtagttagattcaggcacattgaagcg-3'
<i>hxnP</i> ribo chim rev	5'-ccaaacagaaccgttataaatctccaccgtacgtagttagattcaggcacattgaagcg-3'
"C" komponens: 2438 bp	
<i>hxnP</i> downst frw	5'-cagagacagcagaatgtagggactgggtc-3'
<i>hxnP</i> downst rev	5'-cgtaaaccgtctcgtctcgtctgacac-3'
"A"+"B"+"C" fúzió: 5878 bp	
<i>hxnP</i> upst nest frw	5'-ctcacgcttgctgagttcgattccatgatg-3'
<i>hxnP</i> downst nest rev	5'-aagcttgatcagcacagtggaatagctg-3'
Transzformánsok szelektálása: 1510 bp	
<i>hxnP</i> frw	5'-gttgatcgagcggctcatgatcaatgagtc-3'
<i>hxnP</i> rev	5'-gcactcagaacaccagcgatattgccag-3'
<i>hxnZ</i> delécio	
"A" komponens: 2532 bp	
<i>hxnZ</i> upst frw	5'-ctactgagcgagagcataatccgtgccgag-3'
<i>hxnZ</i> upst rev	5'-cctaataatgataagtgaggccagacgctg-3'
"B" komponens: 2266 bp	
<i>hxnZ</i> ribo chim frw	5'-cagcgtctggcctcacttatcattattaggcgtacgtagttagattcaggcacattgaagcg-3'
<i>hxnZ</i> ribo chim rev	5'-ccacttatcagcacaaaactctctgacacgggaaaactgccatgactactaggtggtgctatc-3'
"C" komponens: 2530bp	
<i>hxnZ</i> downst frw	5'-cgtgtcagagagtttgctgataagtgg-3'
<i>hxnZ</i> downst rev	5'-gttccatcgtacagcatgctgactgcatac-3'
"A"+"B"+"C" fúzió: 6584 bp	
<i>hxnZ</i> upst nest frw	5'-cattgatcatgagccgctcgatcaacatac-3'
<i>hxnZ</i> downst nest rev	5'-gttccatcgtacagcatgctgactgcatac-3'
Transzformánsok szelektálása: 1354 bp	
<i>hxnZ</i> frw	5'-cagatcatcatggaaatcgaaactcgacaag-3'
<i>hxnZ</i> rev	5'-ctgactggatgcagtagttgcggtaggtc-3'

<i>hxnY</i> deléció	
"A" komponens: 2517 bp	
hxnY upst frw	5'-catatcaaatcagagaggagtctatactg-3'
hxnY upst rev	5'-ggatactcaacgattactgctgtttagg-3'
"B" komponens: 2266 bp	
hxnY ribo chim frw	5'-cctaaacagcagtaatcggtgagtatcccgtagctagtgtagattcaggcacattgaagcg-3'
hxnY ribo chim rev	5'-cattatgctagcttacatgacaacaagtacggaaaactgcatgactactaggtggtgctatc-3'
"C" komponens: 2566 bp	
hxnY downst frw	5'-gtactgtgtgcatgtaagctagcataatg-3'
hxnY downst rev	5'-gttgtgtatctcggtgcgaggtctgtgtac-3'
"A"+"B"+"C" fúzió: 6396 bp	
hxnY upst nest frw	5'-gcacgagacacgtcggaatgtatgcaccag-3'
hxnY downst nest rev	5'-ctctgacacgactcctagatagcagcatg-3'
Transzformánsok szelektálása: 980 bp	
hxnY frw	5'-caagctgttacagcaagtacgcgaatcctg-3'
hxnY rev	5'-cagtttggcagacactgcacacatggtctg-3'
<i>hxnT</i> deléció	
"A" komponens: 2666 bp	
hxnT upst frw	5'-ctgtgcagtcattgcgtcatctgcatacac-3'
hxnT upst rev	5'-cgactgtctcagtagactacgtcatgagc-3'
"B" komponens: 3905 bp	
hxnT paba chim frw	5'-gctcatgacgtagtctactgagacagtcggcacatagctattacacgtatgtttgagac-3'
hxnT paba chim rev	5'-ctatctgtattctgtgtcgtagattcatggtatgttgcctgaatggctaacgaggcattg-3'
"C" komponens: 2654 bp	
hxnT downst frw	5'-gaatactacgacacagaatacagatagac-3'
hxnT downst rev	5'-catagtcttaaccacgagacgatcagtaac-3'
"A"+"B"+"C" fúzió: 7535 bp	
hxnT upst nest frw	5'-cgtcgtcctttcgcttgcctgtttgtatg-3'
hxnT downst nest rev	5'-tctgttctactacaggcagcgagttttgtc-3'
Transzformánsok szelektálása: 1249 bp	
hxnT frw	5'-ctttgcgtgcagcaccgtgtgtccaag-3'
hxnT rev	5'-ctattgagcgaaagggtagtcggtatag-3'

<i>hxnR</i> deléción	
"A" komponens: 3204 bp	
hxnR új up frw	5'-cagattcgaacgtacctggttggtc-3'
hxnR új up AfriboB chim rev	5'-gatcaaacgagccagactcctggtatgtgcaggcgtgtttcttcac-3'
"B" komponens: 2607 bp	
Af riboB hxnR chim frw	5'-gaagaaacacgcctgcacataccaggagtctggctcgtttgac-3'
Af riboB hxnR chim rev	5'-tcagcaagaccttcatagcttgcgaccgtctgatctagattac-3'
"C" komponens: 2787 bp	
hxnR új down AfriboB chim frw	5'-aatctagatcagacggctcgcaagctatgaaggcttgctgaatcttggtg-3'
hxnR új down rev	5'-ctcttgcactgaccttggttcac-3'
"A"+"B"+"C" fúzió: 7611 bp	
hxnR új up nest frw	5'-gtccggttggaagacaaagactc-3'
hxnR új down nest rev	5'-tcagcaagaccttcatagcttgcgaccgtctgatctagattac-3'
<i>hxnR</i> rekontitúciós törzs létrehozása	
hxnR prom NotI frw	5'-tttttttgcggccgcacatctggtgcatacattccgacgtg-3'
hxnR term NheI rev	5'-tttttttgctagccgccggtgagaaactataacagac-3'
hxnR1958F	5'-agagatacagaacatgcatttctccc-3'
hxnR down seq1 rev	5'-ctcagatcgcttcacttccc-3'

Dőlt szekvencia részek: a kiméra primerek 5' végére tervezett kiméra szekvenciák. Aláhúzott szekvenciárészek: bizonyos primerek 5' végére épített restriktációs endonukleáz felismerő motívumok, amik a klónozást segítik.

3. melléklet

Kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakciók során alkalmazott indítószekvenciák

<i>hxnP</i>	
hxnP ReTi frw	5'-tgtactctttgactgcatgg-3'
hxnP ReTi rev	5'-gagtattcgttgccttgag-3'
<i>hxnS</i>	
hxnS ReTi frw	5'-gagcattctatcttgagacga-3'
hxnS ReTi rev	5'-ccattgtgtctgggtactg-3'
<i>hxnT</i>	
hxnT ReTi frw	5'-ctcgaccagtttctacacgac-3'
hxnT ReTi rev	5'-ccgagatgattcaaggacga-3'
<i>hxnY</i>	
hxnY ReTi frw	5'-gtcattcttcgatccttcacc-3'
hxnY ReTi rev	5'-ggttgagttctcgtcttcgt-3'
<i>hxnZ</i>	
hxnZ ReTi frw	5'-cgctgtattcaactttctccc-3'
hxnZ ReTi rev	5'-cagtagttgcggtaggtcag-3'
<i>hxnR</i>	
hxnR ReTi frw	5'-cggcttctgttctactacagg-3'
hxnR ReTi rev	5'-cagtctaggtctggaaagtctc-3'
<i>actin</i>	
actin ReTi frw	5'-ggatcatgatcggtatggg-3'
actin ReTi rev	5'-tatctgagtgtgaggatacca-3'
<i>hxnS</i> szomszédos génje	
AN9174 ReTi frw	5'-ttctttgcacattgccaactc-3'
AN9174 ReTi rev	5'-gcattccaatagcgaagcc-3'
<i>hxnT</i> szomszédos génje	
AN9179 ReTi frw	5'-gtgatgaacgagtacacca-3'
AN9179 ReTi rev	5'-aggacctcgtatgcttgac-3'
<i>A.fumigatus pantoB</i> génje	
Afu pantoB Reti frw	5'-gatatgactggcaactatcctcc-3'
Afu pantoB Reti rev	5'-actgttcgattcctttgatgct-3'

4. melléklet

Szekvenálásra küldött minták előkészítése és a szekvenálások során alkalmazott primer szekvenciák

<i>hxnP</i> felszaporítása, szekvenálása	
hxnP int frw	5'-tattgagaaggttccatcggcc-3'
hxnP int rev	5'-gaaagaagttcatcgccgtcg-3'
hxnP int seq rev2	5'-ccatctcattgcgggtgtaga-3'
<i>hxnS</i> gén klónozása, szekvenálása	
hxnS cDNS EcoRI frw2	5'- <u>gaattc</u> ggactgcaccgagaacccatg-3'
hxnS cDNS EcoRIrev	5'- <u>gaattc</u> tccaggcaacagcaacgaaaaatcc-3'
hxnS cDNS EcoRI frw3	5'- <u>gaattc</u> atggacgccctcctccgagatc-3'
hxnS F0	5'-atggacgccctcctccgagatcatcg-3'
hxnS F420	5'-gggaagttccagctatccgcggatgatatcg-3'
hxnS F820	5'-tcgccaattcgtacccgaactg-3'
hxnS F1227	5'-ggaaacattgccacggcgtctc-3'
hxnS F1627	5'-aggctgtgctcgatcgttctc-3'
hxnS 2030	5'-gggcgctgtgggatgttgatcatacttctc-3'
hxnS F2430	5'-gacgggagtaggatgtttgga-3'
hxnS F2830	5'-acatcccgaatgtctggctgcg-3'
hxnS F3230	5'-ccgtgtctacacagcgatcag-3'
hxnS F3636	5'-tttactcaggagtgatgcatgca-3'
hxnS F4055	5'-ggtaagcgagccgttggtctagac-3'
hxnS R275	5'-gtgataacatgctttccagatactc-3'
<i>hxnR^c</i> és funkcióvesztett mutánsok klónozása, szekvenálása	
hxnR XbaI frw	5'- <u>ctagac</u> agctaatacctgcagtatagactcctc-3'
hxnR KpnI rev	5'- <u>ggtagc</u> ctcaatagacatgaatactacgacac-3'
hxnR 2F	5'-gcacgcttatcgtctccactg-3'
hxnR 800F	5'-gtatgatgccaatacagtaaagctacc-3'
hxnR 1375F	5'-cttctccgcttcaatactacatacc-3'
hxnR 1958 F	5'-agagatacagaacatgcatttctccc-3'
<i>hxnR-gfp</i>, <i>hxnR</i> rekonsztitúciós konstrukciók szekvenálása	
1pGpD int frw	5'-cagtataattcatcttccatccaagaac-3'
hxnR 101R	5'-ctgttactgatcgtctcgtgg-3'
<i>hxnR-gfp</i>, <i>hxnR</i> rekonsztitúciós konstrukciók szekvenálása	

hxnR 336F	5'-gtcttcgggctctgtctctg-3'
hxnR 448R	5'-gggtcagttccatcgctcgc-3'
GFP3' int. frw	5'-caaagaccccaacgagaagc-3'
hxnR ell.2 rev2	5'-cgatctgcaggtccagtacttc-3'
5GfpNcoIstart frw	5'-tttttttccatggtgagcaagggcgaggagc-3'
GFP ReTi frw	5'-atcttctcaaggacgacgg-3'
hxnR Cl rev	5'-ctcaatagagcatgaatactacgacac-3'

A *hxnR-gfp* és *hxnR* rekonsztitúciós konstrukciók szekvenálása során alkalmazott primer listánál csak azokat tüntettem fel, amelyeknek szekvenciája a „*hxnR*” és funkcióvesztett mutánsok klónozása, szekvenálás”részben nem szerepelnek. Aláhúzott szekvenciárészek: bizonyos primerek 5' végére épített restrikciós endonukleáz felismerő motívumok, amik a klónozást segítik.

5. melléklet

A *hxnR-gfp* konstrukciók előállításához felhasznált primerek szekvenciái

pAN-HZS-5 vektor létrehozása	
PprnD <i>NheI</i> frw	5'-ttttgctagccagattgctgagtcacggcttacc-3'
PprnD <i>NcoI</i> rev	5'-ttttccatgggttggtagaaagtgtacgaaagcg-3'
C-terminális fúziók	
Natív és <i>prnD</i> promóteres konstrukciók	
hxnR up nest frw	5'-tggcaagacaaagactcctcattac-3'
hxnR int <i>NcoI</i> err rev	5'- gctcggcgctccatcgccctcttccacgcgtcttc -3'
hxnR int <i>NcoI</i> err frw	5'- ggaagagggcgatggacgccgagcagcgcaag -3'
hxnR down seq1 rev	5'-ctcagatcgcttcacttccc-3'
hxnR prom <i>NcoI</i> frw	5'-tttttttccatggcggtatttctgtaggcacagag-3'
hxnR nest link <i>NcoI</i> rev	5'-tttttttccatgggtatcaagatcgactgtatcaataagaacaccaagattcagcagaccttc-3'
hxnR down frw	5'-ctggagtagcttgcataactgtctatc-3'
<i>gpd</i> promóteres konstrukció	
hxnR nest <i>NcoI</i> frw	5'-tttttttccatgggttaaagcgaagatgaagaaacacg-3'
Lókuszt integrált konstrukció	
Afu <i>riboB</i> frw	5'-caaggcggactgagttatggatg-3'
Afu <i>riboB</i> hxnR down chim rev	5'- <u>gcaagctactccagaaaaagatagcaatca</u> cttgcgaccgtctgatctagattac-3'
hxnR down Afu <i>riboB</i> chim. frw	5'- <u>gtaatctagatcagacggctgcaagt</u> gattgctatcttttctggagtagcttgc-3'
hxnR down rev	5'-aaggctcttctcgattgctgtagctg-3'
Afu <i>riboB</i> <i>NdeI</i> frw	5'-tttttttccatagcaggagctctggctcgtttgac-3'
hxnR down nest <i>NdeI</i> rev	5'-tttttttccatagccatgctgtctcgtctgaaggacgac-3'
N-terminális fúzió	
"A" komponens	
hxnP frw2	5'-gactcctcattactccatatacacagc-3'
hxnP rev2	5'-cttcttagccttttggtgctatttaag-3'
"B" komponens	
hxnP Af panto chim frw	5'-cttaaatagcaccacaaaaggctaagaagcgaacgaattagatctttggaggttg-3'
Af panto rev	5'-tggagagtgagtattcttgcacttg-3'

"C" komponens	
hxnR prom frw	5'-catctggtgcatacattccgacgtg-3'
hxnR prom rev	5'-cttcgctttcattcccagctac-3'
"D" komponens	
hxnR prom GFP chim frw	5'-gtacgctgggaatgaaagcgaagatggtgagcaagggcgaggagc-3'
GFP rev	5'-catggagctattaaatcactagaaggcac-3'
"E" komponens	
hxnR SmaI frw	5'-tttttttcccgggatgaagaaacacgcctgcacatacc-3'
hxnR XbaI rev	5'-tttttttctagacgagttcatgttcagacagtcggc-3'
"A"+"B" fúzió	
hxnP int frw	5'-cagtcctcattctccgttctccattc-3'
Afu panto int rev	5'-cgtactctatgacgccagcattc-3'
"C"+"D" fúzió	
Afu panto hxnR prom int chim frw	5'-gaatgctggcgctcatagagtacggtaggcacagagacagcagaatgtagg-3'
GFP int rev	5'-cgacaccaacgatcttatatccagattcg-3'
"AB"+"CD" fúzió	
hxnP int KpnI frw	5'-tttttttggtaccccaaacagaaccgtttataaatctccac-3'
GFP int linker HpaI rev	5'-tttttttgtaacggcaccggctccagcgctgcaccagctccctgtacagctcgccatgccg-3'
"ABCD"+teljes <i>hxnR</i> felszaporítása	
gfp-hxnR kazetta XbaI frw	5'-tttttttctagaccaaacagaaccgtttataaatctccac-3'
gfp-hxnR kazetta XbaI rev	5'-tttttttctagagagaccgtcctcgcatctgataaag-3'

Aláhúzott szekvenciárészek: bizonyos primerek 5' végére épített restrikciós endonukleáz felismerő motívumok, amik a klónozást segítik. Dőlt szekvencia részek: a kiméra primerek 5' végére tervezett kiméra szekvenciák. Vastagon szedett szekvencia részek: beépített linker szekvenciák.

6. melléklet

Az *hxnR* lókuszt ortalógjai és a HxnR ortalógok azonosító száma

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
Eurotiomycetes			
Aspergillus nidulans FGSC A4	AACD01000170.1 :23303-25963	AN11197	CBF82382 (az N-terminális rész 6 AS-val hosszabb)
(JGI) Aspergillus sydowii CBS 593.65	scaffold_14 380488 382993	(JGI)	
(JGI) Aspergillus versicolor CBS 583.65	scaffold_16 324591 327084 (AP)	(JGI)	
Aspergillus oryzae RIB40	AP007164.1 :c2325614-2323089	AOR_1_1570114	XP_003190358
Aspergillus flavus NRRL 3357	AAIH02000271.1 :c19461-16936	AFLA_063610	XP_002379105 (a protein N-terminális része 50 AS-val rövidebb)
Aspergillus sojae NBRC 4239	BACA01000149.1 :14054-16582	NA	
Aspergillus terreus NIH 2624	AAJN01000215.1 :c59094-56517	ATEG_08618	XP_001217204 (Az N-terminális rész túl hosszú és deléciókat hordoz)
(JGI) Aspergillus aculeatus ATCC 16872	scaffold_11 1086464 1088927	(JGI)	
(JGI) Aspergillus carbonarius ITEM 5010	scaffold_11 986537 989113 (AP)	(JGI)	
Aspergillus niger CBS 513.88	NT_166520.1 :282679-285269	ANI_1_1050034	XP_001390050
(JGI) Aspergillus brasiliensis CBS 101740	scaffold_12 149966 152584		
Aspergillus kawachii IFO 4308	BACL01000152.1 :c87133-84533	AKAW_05051	GAS86937 (az N-termális rész túl rövid, és egy intront figyelmen kívül hagynak a kódoló szekvenciában)

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
(JGI) Aspergillus tubingensis CBS 134.48	scaffold_3 293413 296013	(JGI)	
(JGI) Aspergillus wentii DTO 134E9	scaffold_10 94813 97253	(JGI)	
(JGI) Aspergillus glaucus CBS 516.65	scaffold_3 1123372 1126027	(JGI)	
JGI) Eurotium rubrum CBS 135680 aka Aspergillus ruber	scaffold_2 25866 28521 (AP)	(JGI)	
Penicillium carneum LCP05634	CBXS010002886.1 4010-6563	NA	
Penicillium roqueforti FM164	CBMR010000287.1 11236-13789	PROQFM164_S04g001025	CDM36144 (az N-terminális rész 5 AS-val hosszabb)
Penicillium camemberti FM 013	CBVV010000512.1 c46348-43798	PCAMFM013_S022g000208	CRL27528 (az N-terminális rész 5 AS-val hosszabb)
Penicillium aurantiogriseum NRRL 62431	ALJY01002280.1 c4202-1667	NA	
Penicillium biforme FM169	CBXO010000164.1 34125-36675	NA	
Penicillium paneum FM227	CBXN010000112.1 184473-187026	NA	
Penicillium fuscoglaucum FM041	CBXP010000195.1 35162-37712	NA	
Penicillium digitatum Pd1	AKCU01000378.1 c73339-70788	PDIP_55780	XP_014532804 (az N-terminális rész túl rövid)
Penicillium paxilli ATCC 26601	AOTG01000616.1 31558-34092	NA	
Penicillium citrinum strain DSM 1997	LKUP01000591.1 17538-22514	NA	
(JGI) Monascus purpureus NRRL 1596	scaffold_46 125844 128757 (AP)	(JGI)	

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
Talaromyces stipitatus ATCC 10500	ABAS01000027.1 :c149321-146803	TSTA_050470	XM_002485516
Talaromyces marneffei ATCC 18224	ABAR01000002.1 :1362859-1365445	PMAA_031780	XP_002144843 (az N-terminális rész túl hosszú)
JGI) Talaromyces aculeatus ATCC 10409	scaffold_1 4922711 4925290	(JGI)	
Byssosclamyces spectabilis No. 5	BAUL01000291.1 :9840-12835	PVAR5_8008	GAD99297
(JGI) Thermoascus aurantiacus ATCC 26904	scaffold_9 344642 347679 (AP)	(JGI)	
Blastomyces gilchristii SLH14081 aka Ajellomyces dermatitidis	ACBU01001509.1 :c45470-42265	BDBG_09400	XP_002620220 (frameshift-et okozó deléciókat hordoz)
Histoplasma capsulatum G186AR aka Ajellomyces capsulatus	ABBS02000272.1 :10427-13670	HCBG_09164	EEH02599 (deléciókat hordoz)
Paracoccidioides brasiliensis Pb03	ABHV01000435.1 :c135719-132432	PABG_12465	KGY14693
(JGI) Gymnascella aurantiaca NRRL 5967	scaffold_35 17908 20763 (AP) (Pseudo gene)	(JGI)	
Cyphellophora europaea CBS 101466	AOBU01000059.1 :131907-134781	HMPREF1541_08507	XP_008722826 (az N-terminális rész 30 AS-val rövidebb)
Capronia coronata CBS 617.96	AMWN01000007.1 :33338-36527	A1O1_07578	XP_007728445 (a protein N-terminális része 60 AS-val rövidebb)
Capronia epimyces CBS 606.96	AMGY01000008.1 :20872-24090	A1O3_08403	XP_007738501 (az N-terminális rész túl rövid és deléciókat hordoz)

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
Phaeomoniella chlamydospora RR-HG1	JACF01000099.1 :c48660-45889	NA	
Phaeomoniella chlamydospora UCRPC4	LCWF01000106.1 :c48562-45791	UCRPC4_g04414	KKY19713 (rosszul annotált, nem felismerhető szekvencia)
Dothideomycetes			
Phaeosphaeria nodorum SN15	AAGI01000083.1 :101735-105051	SNOG_04192	XP_001794616 (a protein N-terminális része 100 AS-val rövidebb)
Pyrenochaeta sp. UM 256	AOUM01000070.1 :33523-36976	NA	
Pyrenochaeta lycopersici CRA-PAV_ER 1211	GAJI01016548.1 :c2908-83 (TSA: transcribed RNA sequence)	NA	
Pleosporales sp. UM 1110	AJMS01010346.1 :25001-28253 NB. Partial at edge of contig	NA	
Leptosphaeria maculans JN3	FP929127.1 :1907810-1911512	LEMA_P029460	XP_003839273 (deléciókat hordoz és a protein a 70 AS-val rövidebb)
Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP	AAXI01000364.1 :12305-15633	PTRG_07699	XP_001938031 (deléciókat hordoz és a protein a túl rövid)
Pyrenophora teres f. teres 0-1	AEEY01001409.1 :c51169-47837	PTT_07496	XP_003297180 (a fehérje 80 AS-val rövidebb)
Pyrenophora seminiperda CCB06	ATLS01000051.1 :c49074-45770	NA	
Alternaria brassicicola ATCC 96836	ACIW01000963.1 :56805-59911	NA	
Alternaria arborescens EGS 39-128	AIIC01000105.1 :c36091-33125	NA	

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
Shiraia sp. Slf14	AXZN01000045.1 :c355891-352787	NA	
Corynespora cassicola UM 591	JAQF01000510.1 :94995-98309	NA	
(JGI) Cucurbitaria berberidis CBS 394.84	scaffold_4 491158 494514	(JGI)	
(JGI) Didymella exigua CBS 183.55	scaffold_30 129433 132777 (AP)	(JGI)	
(JGI) Dothidotthia symphoricarpi CBS 119687	scaffold_4 1553600 1556996 (AP)	(JGI)	
(JGI) Lentithecium fluviale CBS 122367	scaffold_19 66693 69719	(JGI)	
(JGI) Lophiostoma macrostomum CBS 122681	scaffold_181 15049 18274	(JGI)	
(JGI) Melanomma pulvis-pyrius CBS 109.77	scaffold_214 56963 60202	(JGI)	
(JGI) Pleomassaria siparia CBS 279.74	scaffold_17 632646 636107 (AP)	(JGI)	
Helminthosporium solani B-AC-16A	AWWW01001360.1 :16328-19540 NB. Partial at edge of contig	NA	
Hysterium pulicare EB0238	AJFK01000232.1 :c29646-26356	NA	
Rhytidhysterium rufulum CBS 306.38	AJFL01001926.1 :c3544-206	NA	
Macrophomina phaseolina MS6	AHHD01000030.1 :100300-104036	MPH_00565	EKG22110 85 (az N-terminális rész 85 AS-val rövidebb)

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
Neofusicoccum parvum UCRNP2	AORE01000907.1 : c3154-1 (N-terminus) AORE01001369.1 : 7-579 (C-terminus)	UCRNP2_5271 (N-terminális rész)	XP_007584552 (N-terminális rész)
(JGI) Botryosphaeria dothidea CBS 115476	scaffold_402 35000 38696	(JGI)	
(JGI) Aplosporella prunicola CBS 121.167	scaffold_2 624735 628493 NB. Partial at edge of contig	(JGI)	
(JGI) Mycosphaerella fijiensis CIRAD86 aka Pseudocercospora fijiensis	scaffold_5 809879 812505	(JGI)	
Pseudocercospora pini- densiflorae CBS 125139 aka Mycosphaerella gibsonii	AWYD01000740.1 :c516816-514199	NA	
Mycosphaerella laricina CBS 326.52	AWYE01001109.1 :c24071-21180	NA	
Mycosphaerella sp. Ston1	AWYF01000450.1 :10814-14321	NA	
Cladosporium sphaerospermum UM 843	AIIA01013032.1 :c 3614-1084 NB. Partial at edge of contig	NA	
(JGI) Dothistroma septosporum NZE10	scaffold_6 602123 604975	(JGI)	
(JGI) Septoria musiva SO2202 aka Sphaerulina musiva	scaffold_6 979027 982647 (AP)	(JGI)	

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
(JGI) <i>Zasmidium cellare</i> ATCC 36951	scaffold_6 549912 552542 (AP)	(JGI)	
<i>Aureobasidium pullulans</i> AY4	AMCU01000011.1 :c35282-32442	NA	
(JGI) <i>Aureobasidium pullulans</i> var. subglaciale EXF-2481	scaffold_10 149795 152616 (AP)	(JGI)	
(JGI) <i>Cenococcum geophilum</i> 1.58	scaffold_11 229142 232863	(JGI)	
(JGI) <i>Lepidopterella palustris</i> CBS 459.81	scaffold_77 61204 64603 (AP)	(JGI)	
(JGI) <i>Myriangium duriae</i> CBS 260.36	scaffold_14 693037 695801 (<i>hxnR1</i>) scaffold_8 1253906 1256729 (AP) (<i>hxnR2</i>)	(JGI)	
(JGI) <i>Patellaria atrata</i> CBS 101060	scaffold_16 57894 61339	(JGI)	
(JGI) <i>Zopfia rhizophila</i> CBS 207.26	scaffold_19 184161 3 1844800	(JGI)	
Sordariomycetes			
<i>Fusarium oxysporum</i> Fo5176	AFQF01002414.1 :17394-20421	FOXB_07972	EGU81522
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287	AAXH01001227.1 :c8745-5697	FOXG_17380	KNB20316
<i>Fusarium fujikuroi</i> B14	ANFV01000166.1 :c39590-36504	NA	
<i>Fusarium verticillioides</i> 7600 aka <i>Gibberella moniliformis</i>	AAIM02000142.1 :128314-131338 (<i>hxnR1</i>) AAIM02000047.1 :c211441-208608 (<i>hxnR2</i>)	FVEG_11007 FVEG_03388	EWG52212 EWG41242 (nem homológ régió a fehérje közepén)

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
Fusarium acuminatum CS5907	CBMG010000685.1 53703-56749	NA	
Nectria haematococca mpVI 77-13-4	ACJF01000056.1 c115648-112600	NECHADRAF T_102108	XP_003040920 (az N-terminális rész 16 AS-val hosszabb)
Fusarium virguliforme Mont-1	AEYB01000915.1 47734-50770	NA	
(JGI) Ilyonectria sp. (Ilyonectria radicola complex)	scaffold_4 3041407 3044563	(JGI)	
Glomerella graminicola M1.001 aka Colletotrichum graminicola	ACOD01000324.1 c55773-52579	GLRG_11296	XP_008100172
Colletotrichum orbiculare MAFF 240422	AMCV01004979.1 c255501-252355	Cob_08884	ENH82459 (egy intront figyelmen kívül hagynak)
Colletotrichum fiorinae PJ7	JARH01000269.1 c346795-343566	CFIO01_01344	XP_007593481
(JGI) Glomerella acutata aka Colletotrichum fiorinae MH 18	scaffold_49 221146 224379 (AP)	(JGI)	
Colletotrichum gloeosporioides Cg-14	AMYD01000831.1 c17493-14325	CGLO_04093	EQB55919 (a gén hosszú deléciót hordoz)
(JGI) Glomerella cingulata 23 aka Colletotrichum gloeosporoides	scaffold_2 843861 847029 (AP)	(JGI)	
Grosmannia clavigera kw1407	ACXQ02000048.1 c376723-380065	CMQ_5378	XP_014174598 (egy annotált intron nem létezik)
Ophiostoma novo-ulmi subsp. novo-ulmi H327	AMZD01000132.1 c73343-76666	NA	
Ophiostoma piceae UAMH 11346	AQHS01000229.1 c128284-131592	F503_04661	EPE04146

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
Pestalotiopsis fici W106-1	ARNU01000067.1 :c206030-203109	PFICI_03297	XP_007830069
Daldinia eschscholzii UM1020	AIID01007324.1 :c3008-69	NA	
(JGI) Anthostoma avocetta NRRL 3190	scaffold_33 540390 543402 (AP)	(JGI)	
(JGI) Hypoxylon sp. CI-4A	scaffold_65 28475 31363	(JGI)	
(JGI) Hypoxylon sp. CO27-5	scaffold_173 36751 39802	(JGI)	
(JGI) Hypoxylon sp. EC38	scaffold_19 28113 31172	(JGI)	
Diaporthe longicolla MSPL 10-6	AYRD01007761.1 :c16270-13226	NA	
Togninia minima UCRPA7 aka Phaeoacremonium aleophilum	AORD01000689.1 :c71201-68278	A lókuszt nem ismert	
Leotiomycetes			
Glarea lozoyensis ATCC 20868	ALVE01000002.1 :c428703-431536	GLAREA_08870	XP_008076022
(JGI) Amorphantheca resinae ATCC 22711	scaffold_11 1036280 1039464 (AP)	(JGI)	
(JGI) Chalara longipes BDJ	scaffold_6 1389484 1392661	(JGI)	
(JGI) Meliniomyces bicolor E	scaffold_15 875918 879209	(JGI)	
(JGI) Meliniomyces variabilis F	scaffold_4 1069211 1072404	(JGI)	
Fungal sp. EF0021	AIET01001355.1 :c32028-935093	NA	

Fajok (126 Pezizomycotina)	<i>hxnR</i> gén lókuszt (manuálisan levezetett)	Lókuszt szám (NCBI)	Protein azonosító szám (NCBI)
(JGI) Xylona heveae TC161	scaffold_2 3056269 3059646	(JGI)	
(JGI) Trinosporium guianense CBS 132537	scaffold_77 88733 92038	(JGI)	
(JGI) Symbiotaphrina kochii CBS 250.77	scaffold_6 1202438 1205513	(JGI)	
Pezizomycetes			
Tuber melanosporum Mel28	CABJ01000281.1 c 145729-143254)	GSTUM_00007 914001	XP_002839756 (C-terminális rész nem helyes)
(JGI) Choioomyces venosus 120613-1	scaffold_106 6103 9595	(JGI)	
(JGI) Morchella conica CCBAS932	scaffold_64 63084 65030 (AP)	(JGI)	
(JGI) Morchella importuna SCYDJ1-A1	scaffold_44 107091 109037	(JGI)	

NA: a genom nem annotált

NB: minden gén modell manuálisan levezetett

szürke színű szöveg: a géneket vagy helytelenül annotálták vagy a géntermékek vélhetőleg nem funkcionálisak.

AS: aminosav

A listát Michel Flippin állította össze.