

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

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**ÁMON JUDIT**

**TÉMAVEZETŐ:**

**DR. HAMARI ZSUZSANNA**

**EGYETEMI DOCENS**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



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

**SZEGED**

**2018**

## Bevezetés

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, amelyeket bevonhatnak a gyógyszer- és növényvédőszer alapanyagok előállításába és ezáltal csökkenthetik a hatóanyagok előállítási költségeit.

Az évek során számos prokarióta szervezetet azonosítottak, amelyek képesek a nikotinsavat (NA) lebontani, szén- és nitrogén forrásként hasznosítani, de az eukarióták katabolikus útvonalának feltárása máig sem történt meg. Az útvonalról szerzett eddigi információink a purin lebontási útvonal tanulmányozása kapcsán kerültek felszínre, amikor felismerték, hogy az *A. nidulans* modellszervezetben a hipoxantin xantinná történő hidroxilálását a PHI mellett egy másik xantin dehidrogenáz, a PHII-nek nevezett enzim is el tudja végezni. 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 suggallta, hogy a PHII nem a purin lebontási útvonal, hanem a NA katabolikus útvonal szabályozása alatt áll.

Ezen úttörő ismeretek nyomán kutatócsoportunk elsőként kezdte el az *A. nidulans* eukarióta modellszervezetben a NA katabolikus útvonal szabályozásának és biokémiai hátterének részletes feltárását.

## Célkitűzések

Jelen munka során célul tűztük ki:

- annak igazolását, hogy a PHII a *hxnS* gén, a HxnR pedig az AN11197 gén termékével azonos
- a HxnS és HxnR szerkezet-funkció vizsgálatát
- Génexpressziós vizsgálatokkal:
  - a HxnR szerepének felderítését
  - a *hxnR*-t és *hxnS*-t határoló gének génexpressziós vizsgálatát
  - az AreA ko-regulátor szerepének vizsgálatát
- a koregulációt mutató gének NA hasznosításban betöltött lehetséges szerepének feltárását
- a HxnR intracelluláris lokalizációjának vizsgálatát

## Alkalmazott módszerek

### A kísérletekben használt sejtek tenyésztése

*E. coli*, *A. nidulans* törzsek fenntartása, tenyésztés táptalajon és folyadék kultúrába.

### Molekuláris technikák

DNS, RNS és fehérje izolálás fonalas gombából; cDNS szintézis; *A. nidulans* protoplasztálás -transzformálás; kompetens *E. coli* készítés és kémiai transzformálás; plazmid kivonás baktériumból; PCR, qRT-PCR, Double-Joint PCR; DNS gélelektroforézis; molekuláris klónozás

### Egyéb módszerek

Southern-hibridizáció; *A. nidulans* törzsek heterozigóta keresztezése; UV mutagenézis kísérletek; enzim aktivitás vizsgálat; nitrogénforrás hasznosítási tesztek és inducer képződés tesztek; fluoreszcens mikroszkópia, lézer szkennelő mikroszkópia; *In silico* vizsgálatok

## Eredmények

### A HxnS-t és HxnR-t kódoló gének azonosítása (Ámon és mtsai.; 2017)

Mivel a PHI és PHII vélhetően paralóg fehérjék, kollaborációs partnereinkkel 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 transzkripció faktorát, a *hxnR*-t kódolja. A deléció *hxnS* és *hxnR* valamint PHII enzimaktivásban gátolt mutánsokkal (*hxnS29*, *hxnS35*, *hxnS41*, *hxnR2*) végeztünk növekedési és enzim aktivitás tesztek, amelyekkel bizonyítottuk, hogy a PHII-öt a *hxnS* gén, míg a HxnR-t az AN11197 gén kódolja.

A mutánsok szekvencianalízisével azonosítottuk a mutánsok enzimaktivitás hiányáért felelős változásokat. *hxnS35*-ben és *hxnS41*-ben lánc terminációt előidéző mutáció eredményezte a PHII enzim működésének teljes gátlását, míg a *hxnS29* konzervált régióján belül bekövetkezett aminosav csere a PHII enzim csökkent működését okozta, valószínűleg az enzim stabilitásának gyengítésével.

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 (AS) szekvenciáival és kijelöltük azokat az AS-kat, amelyek konzerváltak nem csak a HxnS, de az adatbankban található összes HxnS ortológ esetében. Külön jelöltük azokat a konzervált régióba eső AS-akat, amelyek eltérést mutatnak a HxA-ban vagy pedig a *B. taurus* XDH-ban. A HxnS paralóg a HxA-val, így a funkcionyerést vagy –vesztést eredményező AS különbségek választ adhatnak arra, hogy a HxnS hogyan tett szert különleges, NA kötő és hidroxiláló képességére az evolúció során.

Megvizsgáltuk a NA katabolikus útvonal specifikus transzkripció faktorának (HxnR) szerkezetét. A *hxnR* egy Cys2His2 cink-ujj proteint kódol,

aminek C-terminális részén a két Cys2His2 motívumot NLS és NES szignálok, valamint gomba-specifikus transzkripció faktor domének követnek.

Konstitutív HxnR mutánsok izolálásával és elemzésével megkezdjük a HxnR funkció vizsgálatát. A konstitutív *hxnR* allélok szekvencia analízise során azonosítottuk azokat az AS változásokat, amelyek a fehérje konstitutív kifejeződéséhez vezetnek. 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 *Pezizomycotina* faj lehetséges ortológ fehérje szekvenciáit felhasználva elkészítettük a HxnR CONSURF modelljét, majd 3D képét. A *hxnR* mutánsok szekvenciaanalízise során azonosított konstitutivitást-, valamint funkció veszteséget okozó mutációk mindkét modell esetén erősen konzervált régióra térképeződtek, amelyek a 3D modell alapján a fehérje külső felszínén, egymással szemben lokalizálódnak.

### **Egy szorosan konzervált génklaszter felfedezése a VI. kromoszómán (Ámon és mtsai.; 2017)**

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. A *hxnS* és *hxnR* környezetében található gének expressziós mintázatának vizsgálatával további 4 gént (*hxnP*, *hxnT*, *hxnZ* és *hxnY*) azonosítottunk, amelyek koregulációt mutatnak: csak NA vagy 6-NA indukció hatására expresszálódnak és kifejeződésük a HxnR-től függ. Az eredményeknek köszönhetően egy 6 génből álló génklasztert azonosítottunk a VI. kromoszómán, amit *hxn* klaszternek nevezünk el. A qRT-PCR eredmények alátámasztották, hogy a *hxnR* 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.

Az ammónium drasztikusan gátolta a klaszter összes génjének kifejeződését, beleértve a *hxnR*-t is. 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 funkcióvesztéses és derepresszált *areA* mutánsok vizsgálatával. Génexpressziós vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a HxnR mellett az AreA a NA lebontási útvonalban is esszenciális a klaszter gének kifejeződéséhez, melyekre pozitív szabályozóként fejt ki hatását.

### **A *hxn* gének *in silico* vizsgálata**

Az adatbankban publikált, AN11198 lókuszhoz 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 hely és ebből eredően az ötös exon szekvenciája is helytelen. A javított génmodellt az adatbankban közöltük.

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

A HxnZ-t szintén az MFS1 szuperfamilia 12 TM fehérjéjeként azonosítottuk, amely valószínűleg a NA hasznosítási útvonalhoz kapcsolódó néhány aromás metabolitot transzportálja.

A *hxnT* gén egy flavin-oxidoreduktázt kódol, ami NADH dehidrogenáz aktivitással is rendelkezik, amit enzimaktivitás festéssel igazoltunk.

Az NCBI-Blastp alapján a HxnY egy  $\alpha$ -ketoglutarát függő dioxigenáz.

## **A deléciós törzsek létrehozása és azok NA hasznosítási képességének vizsgálata különböző NA származékokon**

Minden *hxn* klasztergénre deléciós mutánst hoztunk létre és vizsgáltuk azok NA hasznosítási képességét. A deléciós mutánsokkal végzett növekedési tesztek során a NAA és a prokarióta útvonalakból ismert 2,5-DP is az útvonal inducereként mutatkozott. Megállapítottuk, hogy a 2,5-DP a NA katabolikus út intermedier terméke, a NAA pedig egy deaminálást követően betáplálódik a NA katabolikus útvonalba.

Egyik vizsgált gén deléciója sem okozta sem a 6-NA, sem a 2,5-DP hasznosítás képességének teljes elvesztését, ami megerősíti azt a korábbi elképzelésünket, hogy a 6-NA metabolizmusa több útvonalon keresztül zajlik, amelyben a 2,5-DP további metabolizmusában ezen a klaszteren kívül található gének is részt vesznek, amik szintén a *hxnR* szabályozása alatt állhatnak.

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

A NA lebontási útvonal regulátorának funkció vizsgálatát a fehérje intracelluláris lokalizációjának tanulmányozásával egészítettük ki, C-terminális és N-terminális HxnR-GFP fúziós proteinek létrehozásával. 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, amelyek képesek lettek volna a *hxnRΔ* fenotípust egy kópiában komplementálni minden teszt N-forráson. Azok a transzformánsok, amelyek nagyobb példányszámban tartalmazták a konstrukciókat, csak 6-NA és a diagnosztikai hipoxantin táptalajon (1 mM 6-NA inducer) mutattak részleges komplementációt, míg NA nitrogén forráson egyáltalán nem voltak képesek növekedni.

A későbbiekben bizonyítottuk, hogy a transzformálás során alkalmazott, Chaveroco-féle eljárás szerint létrehozott *hxnRA* recipiens törzsben a *hxnR*-t határoló gének halmozottan vannak jelen, amelyek gyakorlatilag kihígítják a rendelkezésre álló HxnR molekulákat a promótereken. A NA-on 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, amellyel 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. Lókuszt integrált tözsek elemzése is ezt a hipotézist támasztotta alá.

A C-terminális fúzió kudarcát követően, amino-terminális GFP-HxnR fúziót hoztunk létre, amelyet Double-Joint PCR technika alkalmazásával létrehozott *hxnRA* törzsbe transzformáltunk. 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 teljes volt a hipoxantin diagnosztikus táptalajokon, ahol a növekedés a metabolikus inducer képződésétől és a HxnS aktiválásától függ, az egykópiás *gfp-hxnR* lókuszt integrált törzs növekedése messze elmaradt az egykópiás rekonstitúciós törzsnél tapasztalt növekedéstől. Ráadásul, NA és 6-NA táptalajokon nem történt komplementáció még magas kópiaszám esetén sem. Az eredményeket azzal magyarázhatjuk, hogy ebbe az esetben a GFP-HxnR a HxnS promóterrel jól együtt tudott működni, aminek köszönhetően a hipoxantin diagnosztikus táptalajon különösen jó növekedés figyelhető meg. Mivel a NA és a



6-NA hasznosításához más *hxn* gének megfelelő kifejeződése is szükséges, a GFP-HxnR elégtelen működése már egyetlen *hxn* promóteren is a 6-NA (pl. *hxnT*) vagy NA hasznosítás rendellenességét okozhatta. Ezen eredményeket az AreA és HxnR kötőhelyek különböző *hxn* promótereken történő eltérő elrendeződésével magyaráztuk.

Mindezeket összegezve elmondhatjuk, hogy mind a C-terminális, mind pedig az N-terminális részhez fuzionáltatott GFP zavarja a HxnR funkcióját, ezáltal alkalmatlannak bizonyult a fúziós fehérje a HxnR fiziológias 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.

## Összefoglalás

Jelen munka során:

- bizonyítottuk, hogy a PHII enzimet a *hxnS* gén, a HxnR-t pedig az AN11197 gén kódolja
- azonosítottuk a HxnS és HxnR enzimek aktivitásáért, illetve szubsztrátspecifitásáért felelős AS régiókat
- a HxnR szerkezeti vizsgálata során a két Cys2His2 cink-ujj doménon kívül NLS és NES szignált valamint gomba-specifikus transzkripció faktor doméneket azonosítottunk
- kijelöltük a *hxnS* és *hxnP* helyes cDNS szekvenciáját
- azonosítottunk egy 6 génből álló génklasztert a VI. kromoszómán, amit *hxn* klaszternek neveztünk el
- expressziós analízisek során bizonyítottuk, hogy

- a HxnR a NA katabolikus útvonal transzkripciós faktora
  - a *hxnR* nem represszált körülmények között derepresszáldik és autoregulációt mutat
  - az urea kísérleti rendszerünkben gátló nitrogénforrásként hat
  - az AreA a klaszter gének pozitív koregulátora
- meghatároztuk a klasztereződést mutató gének lehetséges funkcióit
  - megerősítést nyert, hogy a NA metabolizmusa több útvonalon keresztül zajlik, amelyben ezen a klaszteren kívül található gének is részt vesznek, amik szintén a *hxnR* szabályozása alatt állhatnak.
  - a HxnR C-terminális és N-terminális részéhez fuzionáltatott GFP is zavarja a HxnR funkcióját, ezáltal alkalmatlannak bizonyult a HxnR fiziológiás intracelluláris lokalizációjának vizsgálatára. A néhány esetben fluoreszcens mikroszkópia során tapasztalt konstitutív sejtmagi jelenlét valószínűleg a fehérje túltermelődése miatt történhetett, és nem feltétlen tükrözi a természetes élettani helyzetet.

### **A disszertáció alapját képező publikáció**

**Ámon J.**, Fernandez-Martin R, Bokor E, Cultrone A, Kelly JM, Flipphi M, Scazzocchio C, Hamari Z; A eukaryotic nicotinate-inducible gene cluster: convergent evolution in fungi and bacteria, *Open Biology* 7:(12) Paper 170199. 17 p. (2017); **IF: 3,286**

### **További publikáció:**

**Ámon J.**, Keisham K, Bokor E, Kelemen E, Vágvölgyi C, Hamari Z; Sterigmatocystin production is restricted to hyphae located in the proximity of hülle cells, *Journal Of Basic Microbiology* 58:(7) pp. 590-596. (2018); **IF: 1,580**

### **Összesített impakt faktor: 4,866**

### **A dolgozat témájához kapcsolódó konferencia összefoglalók:**

**Ámon J.**, Bokor E, Hamari Zs; Structure and function analysis of the nicotinic acid catabolic pathway specific transcription factor, HxnR in *Aspergillus nidulans*; 19<sup>th</sup> Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts 65. p. (ISBN:978-963-306-535-8)

**Judit Ámon.**, Eszter Bokor, Csaba Vágvölgyi, Zsuzsanna Hamari; Comprehensive analysis of HxnT, an enzyme of the nicotinate catabolic route; *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* 64:(Supplement 1) p. 107. 1 p. (2017); 5<sup>th</sup> Central European Forum for Microbiology

**Ámon J.**, Bokor E, Keisham K, Vágvölgyi C, Hamari Z; Study of the intracellular localization of the nicotinate catabolic pathway specific transcription factor, HxnR of *Aspergillus nidulans*; 18<sup>th</sup> Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Book of abstracts, p.49. (ISBN:978-86-6253-059-2)

**Judit Ámon.**, Eszter Bokor, Kabichandra Keisham, Csaba Vágvölgyi, Zsuzsanna Hamari; Expression of the HxnR-Gfp protein driven by three different promoter; 5<sup>th</sup> CESC 2016 Central European Summer Course on Mycology and 2nd Rising Stars in Mycology Workshop: Biology of pathogenic fungi. 74. p. (ISBN:978-963-306-493-1)

**Judit Ámon;** Regulation of the nicotinic acid degradation pathway and study of the evolution of the pathway enzymes; *Acta Biologica Szegediensis* 60:(1) pp. 77-78. (2016); Conference For Doctoral Students In Biology.

**Judit Ámon**, Eszter Bokor, Kabichandra Keisham, Csaba Vágvölgyi, Zsuzsanna Hamari; The intracellular localization of the transcription factor HxnR in *Aspergillus nidulans*; A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium: absztraktkötet, p.4.

**Judit Ámon**, Eszter Bokor, Kabichandra Keisham, Csaba Vágvölgyi, Zsuzsanna Hamari; Otaining and characterization of constitutive HxnR mutants - structure-and-function analysis; A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium: absztraktkötet, p.4.

**Ámon Judit**, Bokor Eszter, Vágvölgyi Csaba, Hamari Zsuzsanna; Study of HxnR, the transcription factor of the nicotinic acid degradation pathway in *Aspergillus nidulans*; Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica 62:(Suppl 1) p. 1. (2015); Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology

**Ámon Judit**, Bokor Eszter, Michel Flippi, Rafael Fernández-Martín, Claudio Scazzocchio, Hamari Zsuzsanna; The nicotinate utilization pathway of *Aspergillus nidulans*; 12<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics (ECFG12). 358. p.