

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HIGH MOBILITY GROUP FEHÉRJÉK ÉLETTANI SZEREPÉNEK  
VIZSGÁLATA *ASPERGILLUS NIDULANS* MODELLSZERVEZETBEN**

**Karácsony Zoltán**



**Témavezető: Dr. Hamari Zsuzsanna**

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2016

## BEVEZETÉS

Az *Aspergillus nidulans* az egyik legjobban tanulmányozott fonalgomba modellszervezet. Ivaros, ivartalan és paraszexuális életciklussal is rendelkező mikroorganizmus, genomja haploid, ezért esetében könnyen alkalmazhatók mind a klasszikus, mind pedig a reverz genetikai módszerek. A faj teljes genomszekvenciája ismert. A faj genetikai módosítása több évtizedes múltra tekint vissza. Számos mutáns törzset hoztak létre véletlenszerű mutagenézissel, valamint a faj célzott genetikai manipulációja is régóta megoldott.

Számos biológiai folyamatot tanulmányoztak az *A. nidulans* modellszervezeten, mint pl. az életciklusát és annak szabályozását, a vegetatív és szexuális reprodukciót, a mitokondriális genomszerveződést és intronmobilitást, az organellumokhoz kötött intracelluláris folyamatokat, a membrántranszport-folyamatokat, a különböző környezeti hatások által kiváltott stresszfolyamatokat az észleléstől a végső stresszválasz kialakulásáig, az apoptózist, a fehérjeevolúciót, a kromatinfunkciót, a metabolikus útvonalakat és azok regulációját. Ez utóbbi területen különösen fontosak az ipari illetve humán egészségügyi szempontból jelentős másodlagos metabolit-termelési útvonalak, és azok regulációjának feltárására irányuló kutatások.

A High Mobility Group fehérjék a kromatinon ható, nem hiszton-típusú fehérjék közé tartoznak. Ez a fehérjecsalád az utóbbi évtizedekben intenzív kutatások tárgyát képezi. Széleskörű szerepük bizonyosodott be számos élettani folyamatban alacsonyrendű eukariótákkal végzett kísérletek eredményeként, emellett az emberben is fontos szerepet töltenek be pl. a veleszületett immunitás és tumorok kialakításában, így egészségügyi vonatkozásuk is jelentős. Egyre több kutatás foglalkozik az *A. nidulans* kromatinszerveződésének és kromatinműködésének tanulmányozásával, amely során vizsgálták a nukleoszómák pozícionálódását promóter régiókban, valamint a hiszton acetyl-transzferázok, hiszton metil-transzferázok és -demetilázok, a kromatin-remodelling komplexek, a heterokromatin protein 1 és a H1 hiszton kromatinszerveződésben és működésben betöltött szerepét. A kromatinkapcsolt, nem hiszton-típusú High Mobility Group fehérjék, így a HMG-box fehérjék (HMGB) tanulmányozása is meglehetősen háttérbe szorult, és napjainkig egyetlen architektúrális HMGB fehérjét sem azonosítottak és jellemeztek *A. nidulans*-ban annak ellenére, hogy az élesztő modellszervezet *Saccharomyces cerevisiae* és *Candida albicans* fajokban évtizedekkel ezelőtt elkezdődött a vizsgálatuk, amely jelenleg is tart. Munkánk célja az *A. nidulans* architektúrális HMGB fehérjéinek azonosítása és élettani

funkciójuk vizsgálata volt, ezzel kibővítve az egyéb tekintetben igen jól jellemzett gombafajjal és a HMGB fehérjék működésével kapcsolatos ismereteket.

## CÉLKITŰZÉSEK

Mivel a régóta kutatott fonalgomba modellszervezetben, az *A. nidulans*-ban egyetlen architektúrális HMG-box fehérjét sem azonosítottak eddig annak ellenére, hogy széles körben kutatják eme modellszervezet kromatinszerveződését és funkcióját, célul tűztük ki a feltételezett architektúrális HMGB fehérjék azonosítását és élettani szerepének felderítését.

A megvalósításhoz bioinformatikai vizsgálatokon alapuló azonosítást és jellemzést követő reverz genetikai és molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálatokat terveztünk (génexpresszió vizsgálat; deléció; gfp-fúzionált fehérje lokalizációjának vizsgálata; a deléciós vegetatív és szexuális spórák csírázókéességének vizsgálata; a deléciós törzsek növekedési képességének tesztelése különböző szén- és nitrogénforrásokon, eltérő pH-n, eltérő hőmérsékleten, oxidatív- és ozmotikus stressz ágens jelenlétében; a deléciós törzsek másodlagos metabolit termelésének monitorozása, a rekonstitúciós és gfp-fúziós törzsek fenotípus komplementáció képességének vizsgálata, valamint a kapott eredményeket magyarázó molekuláris folyamatok kiderítése).

A HmbB szekvenciája mitokondriális és sejtmagi lokalizációs szignált is hordoz, ezért a vizsgálatok elkezdésekor a *hmbBΔ* mutáns vizsgálatára terelődött a hangsúly, mivel kettős lokalizációt mutató gomba mitokondriális HMG-box fehérjét még eddig nem írtak le a szakirodalomban.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

### Klasszikus mikrobiológiai módszerek

- Az *A. nidulans* tenyésztéséhez felhasznált táptalajok és tenyésztési körülmények
- A csírázó és nem csírázó konídiumok elkülönítése a *hmbBΔ* törzs esetében
- Az *Escherichia coli* tenyésztéséhez felhasznált táptalajok és tenyésztési körülmények
- Spórák kolóniaképző képességének vizsgálata
- Szén és nitrogénforrás asszimilációs tesztek, stressztolerancia vizsgálatok

### Bioinformatikai módszerek

- Lokalizációs szignál azonosítása
- Filogenetikai vizsgálatok
- Fehérjeszerkezet meghatározása

## Nukleinsav-alapú technikák

- Totál DNS kivonása *A. nidulans*-ból
- RNS kivonása *A. nidulans*-ból, cDNS szintézise
- Klónozás, konstrukcióépítés
- Polimeráz láncreakció
- Kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)
- Southern-hibridizáció

## Az *A. nidulans* genetikai manipulációja

- Az *A. nidulans* transzformálása deléciók létrehozására vagy fúziós fehérjék kifejeztetésére
- Az *A. nidulans* homo- és heterozigóta keresztezése

## Analitikai módszerek

- A konídiumok cukor- és polialkohol-tartalmának GC-MS analízise
- A sterigmatocisztin vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálata
- A trehalóz vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálata

## Reaktív oxigéngyökök és a semlegesítésükért felelős enzimek és metabolitok mérése

- Glutation-reduktáz (GR) mérése
- Glutation peroxidáz (GPx) mérése
- Glutation-S-transzferáz (GST) mérése
- Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) mérése
- Szuperoxid-dizmutáz (SOD) mérése
- Kataláz (CAT) mérése
- Szuperoxid szabadgyökök mérése
- Diklorofluorescein-diacetát (DCFDA)-oxidáló kapacitás mérése
- Redukált és oxidált glutation (GSH és GSSG) mérése
- NADP és NADPH meghatározása
- Összes tiol mennyiségének meghatározása

## Western blot analízis

## Mikroszkópos vizsgálatok

- GFP-fúziós fehérjék lokalizációjának vizsgálata
- Viabilitási vizsgálatok festési eljárásokat követően

## EREDMÉNYEK

### Kromatinkapcsolt HMG-box fehérjék azonosítása *A. nidulans*-ban

*In silico* (BLAST) vizsgálattal az *A. nidulans* genomjában hét HMG-box domén fehérjét kódoló gént találtunk. A HMG-box domént tartalmazó fehérjék kereséséhez a humán HMGB1 fehérje HMG-box doménjének szekvenciáját használtuk. Ezek a gének az AN2885, AN1267, AN10103, AN3667, AN4734, AN3549 és AN1962 fehérjéket kódolják, melyek közül csak az AN4734 ismert, mint a MatA (MAT2) párosodási típust meghatározó protein. A többi fehérjéről nincsenek ismereteink, azonban az alapján, hogy a HMG-box domén második  $\alpha$ -hélixét megelőző aminosav poláros vagy apoláros, nagy biztonsággal megjósolható, hogy a fehérje szekvencia-specifikusan vagy szekvencia-aspecifikusan kötődik a kromatikus DNS-hez. Amennyiben ez az aminosav poláros, a fehérje szekvencia-specifikus kötődést fog mutatni. Poláros aminosav található a nevezett pozícióban a MatA (AN4734, Asn), AN1962 (Asn), AN3549 (Lys) és az AN3667 (His) esetében, és apoláros aminosav az AN2885 (Phe), AN1267 (Val) és az AN10103 (Pro) fehérjék esetében. Ennek alapján, valamint a monodomén szerveződés alapján úgy tűnik, hogy az AN2885, AN1267 és AN10103 gének által kódolt fehérjék általános DNS-kötő funkcióval bírnak és valószínűleg architektúrális szerepet töltenek be a kromatinban. Az utóbbi három fehérjét HmbA, HmbB és HmbC-nek, a fehérjéket kódoló géneket pedig *hmbA*, *hmbB* és *hmbC*-nek neveztük el az *A. nidulans* elfogadott nevezéktanának megfelelően.

A HmbA egy rövid fehérjét kódol, melyben csak egy HMG-box található a *S. cerevisiae*-ben leírt Nhp6A és Nhp6B redundáns fehérjepárhoz hasonlóan, melyek architektúrális szerepet töltenek be az élesztő kromatin szerveződésében.

A HmbB és ortológjai közül a *P. anserina* mtHMG1 fehérje vizsgálataink alapján valószínűleg tartalmaz egy mitokondriális pre-peptidet az N-terminálison, illetve egy sejtmagi transzportot eredményező motívumot is. A HmbB és a *P. anserina* mtHMG1 fehérjék 3D molekulamodellézése alapján fényt derítettünk arra, hogy az általános HMG-box doménon kívül további két HMG-box domént hordoznak, melyek AS-szekvencia alapján nem azonosíthatóak HMG-box doménnek. Ezeket a doméneket „Shadow-HMG-box” doméneknek neveztük el.

A HmbC két HMG-box domént hordoz. *In silico* vizsgálataink alapján a Hmo1 (*S. cerevisiae*) és Sp-Hmo1 (*S. pombe*) a legközelebbi jellemzett homológjai. Ezek a fehérjék (a

*S. cerevisiae* Hmo2 fehérjével együtt) az N-terminálison egy kevéssé, a C-terminálison pedig egy erősen konzervált HMG-box domént hordoznak, utóbbit egy erősen poláros szekvenciányúlvány követ. Ezt a szerkezeti tagolódást a HmbC fehérjén is megtaláljuk. *S. cerevisiae*-ben a kevéssé konzervált N-terminális domén a Hmo1 fehérjében dimerizációs funkciót lát el, ugyanakkor a Hmo1-el paralóg Hmo2 fehérje esetében DNS-kötő szerepet játszik. A Hmo1 számos szerepet tölthet be, pl. stimulálhatja a Pol-I transzkripció aktivitását a nukleoluszban. A Hmo2 pedig a DNS kettős szálú törése esetén kötődik a DNS-hez és az INO80 komplex részeként részt vesz a kettős szálú törés javításában.

### **A HmbA élettani szerepe**

A *hmbAΔ* és *hmbA*<sup>+</sup> törzsek összehasonlító vizsgálatával megkezdjük a HmbA fehérje élettani szerepének felderítését. A deléciós törzs esetében a növekedési ráta szignifikáns csökkenését tapasztaltuk szénforrásként glükózt, nitrogénforrásként nátrium-nitrátot tartalmazó MM táptalajon. A növekedési rátát ozmostabilizátor (1 M szorbitol) alkalmazása nagymértékben fokozta, így valószínűsíthető a sérült sejtfalszintézis szerepe fenotípus kialakításában.

Megállapítottuk a *hmbAΔ* törzs alacsony pH értékhez (pH 2,2) történő adaptációjának sérülését, mely fenotípus részlegesen komplementálható volt ozmostabilizátor (0,7 M KCl) alkalmazásával, így feltehetőleg ennek a fenotípusnak a kialakításában is szerepet játszhat a sejtfalszintézis sérülése.

Vékonyréteg kromatográfiás vizsgálattal kimutattuk, hogy a *hmbAΔ* törzs esetén nagymértékben lecsökken a sterigmatocisztin mikotoxin és a stresszfaktorok ellen védő trehalóz szintézise a vad típushoz viszonyítva.

### **A HmbB szerkezete és lokalizációja (Karácsony és mtsai. 2014)**

A jelen dolgozatban jellemzett HmbB fehérje néhány új strukturális és funkcionális tulajdonságot mutat. A fehérjét kódoló gén majdnem a teljes Pezizomycotina altörzsben megtalálható és hiányzik a Saccharomycotina csoportból. Az ősi gén tehát, amelyből a nevezett fehérjék eredeztethetők, a Taphrinomycotina és a Pezizomycotina csoportok közös őséiben megtalálható volt (Karácsony és mtsai. 2014). A fehérje hiánya a Saccharomycotina csoportban magyarázható a kódoló gén eltűnésével is.

A HmbB mitokondriális jelenléte együtt jár az általunk „Western blot” eljárás segítségével kimutatott proteolitikus hasítással, ami a fehérje mitokondriális mátrixba történő importját kíséri. Ez a mitokondriális lokalizációt eredményező proteolízis az N-terminális végi ShHMG-boxot megcsonkítja, azonban tudjuk, hogy két HMG-box is elégséges a mtDNS hajlításához. Az MTS (*Matrix Targeting Sequence*) proteolízisét követően a HmbB fehérjén két komplett HMG-box, és két ismeretlen funkciójú N-terminális  $\alpha$ -hélix marad, mely utóbbin sejtmagi szignálszekvencia is található.

A HmbB fehérje N-terminálisához (GFP-HmbB) és C-terminálisához (HmbB-GFP) fuzionáltatott GFP fehérjéket a mikroszkópos vizsgálataink során a gomba minden fejlődési szakaszában a mitokondriumban figyeltük meg. A fúziós fehérjék alkalmanként előfordultak a fiatal és idős micéliumok sejtmagjában is. A HmbB esetében mutatkozó kettős lokalizáció magyarázatára az MTS hasításán vagy nem hasításán (és nem az alternatív splicing-on) alapuló sejtmagi és mitokondriális izoformák létrejöttét feltételezzük. Rendkívül érdekes megfigyelésünk, amely a HmbB sejtmagi lokalizációjának a gombafonal egyes kompartmentjeire való korlátozódását mutatja, felveti a hifa különböző régióinak funkcionális specializáltságát, amelynek tisztázása további kutatásokat igényel.

#### **A HmbB fehérjét kódoló gén kifejeződése (Karácsony és mtsai. 2014)**

Megvizsgáltuk a *hmbB* mRNS kifejeződését a csírázás 30. percében, valamint 3, 8, 22, 36 és 48 óra tenyésztést követően. Megállapítottuk, hogy a HmbB-t kódoló mRNS mennyisége jelentős már az intaktív spórákban is. Az mRNS mennyisége a csírázás első 30 percében lecsökken, majd a csírázás izotropikus fázisának végére (3 óra) ismét megnő, amely növekedés tovább folytatódik a micéliális növekedés során (8, 22, 36 és 48 óra).

#### **A HmbB fehérje szerepe a normális sejt morfológia kialakításában (Karácsony és mtsai. 2014)**

A *hmbB* deléciója a fiatal hifák eltorzult morfológiáját eredményezte. A deléciós törzs elsődleges gombafonalain kerek kitüremkedések képződtek. A jelenségre egy lehetséges magyarázat a sejtalkomponensek sérült szintézise, vagy a sejtfallintegritást szabályozó szignalizációs útvonalak sérülése.

## **A HmbB szerepe szén és nitrogénforrás hasznosító képességben és a stressztoleranciában (Karácsony és mtsai. 2014)**

Megvizsgáltuk a *hmbBΔ* törzs növekedését különböző szén- és nitrogénforrások jelenlétében. A deléciós törzs galaktóz szénforrás használatakor 27%-al ( $p < 0,005$ ), laktóz szénforrás esetén 21%-al ( $p < 0,005$ ), raffinóz szénforrás esetén 17%-al ( $p < 0,005$ ) növekedett lassabban a *hmbB<sup>+</sup>* törzshöz képest. A vizsgált nitrogénforrások közül az ammónium esetén mértünk alacsonyabb növekedési rátát a *hmbBΔ* törzsnél (-13%,  $p < 0,0005$ ) a vad típushoz viszonyítva.

Megvizsgáltuk a mutáns törzsek toleranciáját különböző stresszágenssekkel - ozmotikus stressz (1 M NaCl), hőstressz (42 °C) és oxidatív stressz (0,4 mM menadion és 1,8 mM diamid) – szemben. A deléció hatására 42 °C-on kismértékben csökkent növekedési képességet (-23%,  $p < 0,05$ ), 0,4 mM menadion jelenlétében erősen csökkent növekedést (-85%,  $p < 0,0005$ ) tapasztaltunk. Mindkét deléciós törzs esetében mérsékelt rezisztenciát tapasztaltunk diamiddal szemben. Az oxidatív stressztolerancia részletes vizsgálata során úgy találtuk, hogy az 50%-os gátlást okozó legkisebb menadion-koncentráció ( $MIC_{50}$ ) 0,2 és 0,4 mM közé esett a *hmbB<sup>+</sup>* és HZS.352 (rekonstitúciós kontroll) törzsek esetében, míg a *hmbBΔ* törzs esetében ez az érték 0,05 és 0,1 mM között volt. A deléciós törzs minden vizsgált koncentráción magasabb toleranciát mutatott a diamiddal szemben, 0,05 mM és 0,1 mM koncentrációkban pedig a diamid még fokozta is a törzs növekedési képességét (+9% és +12%,  $p < 0,05$  és  $p < 0,005$ ). Ez utóbbi eredmény arra utal, hogy a HmbB fehérje hiányában a gombasejtek redox állapota olyan módon tér el a normálistól, melyet a diamid a GSH oxidációjával képes részlegesen helyreállítani.

## **A HmbB fehérje hatása a redox környezetre (Karácsony és mtsai. 2015)**

Míg az összes glutation mennyisége nem különbözött a *hmbB<sup>+</sup>* és *hmbBΔ* törzsek konídiumaiban, a GSSG (oxidált glutation) mennyisége 20-szor kevesebb volt a deléciós törzsből. Ez az alacsony ROS (reaktív oxigéngyökök) és SOD (szuperoxid-dizmutáz) aktivitással együtt azt sugallja, hogy a *hmbBΔ* konídiumok redukzív redox állapotban vannak. Feltételezzük, hogy ez az erősen redukzív belső környezet – akár kizárólagos – szerepet játszhat a deléciós törzs ivaros és ivartalan spóráinak rendkívül alacsony csírázókéességében.



A *hmbBΔ* micéliumok magasabb GSSG-tartalma arra utal, hogy a glutation redox-pár az oxidált állapot felé mozdul el, melyet csak kis mértékben tud kompenzálni a kimért GSH (redukált glutation) szint növekedés, ami a redox-pár redukáló kapacitását próbálta növelni. A glutation redox-rendszer oxidált állapotából, valamint a megduplázódott szuperoxid- és SOD-aktivitás mennyiségekből arra következtetünk, hogy a *hmbBΔ* micéliumok endogén oxidatív stressznek vannak kitéve. Feltételezésünk szerint a *hmbBΔ* törzs paradox viselkedése, a menadionnal szemben mutatott fokozott érzékenysége és a diamiddal szemben mutatott toleráns fenotípusa a glutation redox-rendszerben bekövetkező változással és az endogén oxidatív stresszel magyarázható.

A menadionnal történő kezelés során a *hmbBΔ* micéliumok összes glutationtartalma a felére csökkent a *hmbB<sup>+</sup>* törzshöz hasonlóan, a GSSG-tartalom azonban meglepő módon változatlan maradt a mutáns törzsben. Fontos, hogy a *hmbB<sup>+</sup>* micéliumokban a kezelés hatására a GSSG-tartalom 4,2-szeresével csökken, ami egy olyan kompenzációs folyamat eredménye, amelynek szerepe a glutation redox-pár redox potenciáljának fenntartására irányul. Ez a kompenzációs folyamat a *hmbBΔ* micéliumokban nem működik sikeresen és ebből kifolyólag a glutation redox-pár egy oxidáltabb redox állapotba sodródik. Azt, hogy a *hmbBΔ* micéliumok menadion hatására fokozottabb oxidatív stressznek vannak kitéve, további kísérleti eredmények is igazolták. A G6PD (glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz) aktivitása 1,6-szorosával csökkent, ezzel szemben a glutation redox rendszer fenntartásáért felelős enzimek egy része hiperaktiválódott (8,5-szörös növekedés a GR (glutation-reduktáz) és GST (glutation-S-transzferáz); 5,3-szoros növekedés a GPx (glutation-peroxidáz) aktivitásban. Mivel a G6PD felelős a NADP NADPH-vá történő redukálásáért (mely utóbbi a glutation redox rendszer termodinamikai hajtóereje), ezért a G6PD mennyisége limitáló tényezőként jelentkezik a deléciós micéliumokban. A G6PD-aktivitás csökkenése a *hmbBΔ* micéliumokban a glutation redox kör kapacitásának csökkenéséhez vezet, ezért a mutáns törzs nem képes az intracelluláris redukáló erőt pótolni.

A diamid biológiai hatását elsősorban a redukált glutationtartalékok kimerítésén keresztül fejti ki, megváltoztatva a glutation redox-pár redox kapacitását. A *hmbBΔ* micéliumok diamiddal szemben mutatott rezisztenciájának valószínű oka a GSH-tartalomban kereshető, amely a mutáns törzsben az alapállapothoz képest nem változik, a vad típusban azonban lényegesen lecsökken a diamiddal történő kezelés hatására. Azt gondoljuk, hogy ennek oka az, hogy a kezeletlen *hmbBΔ* micéliumokban a magas GSSG-szint által előidézett kompenzációs folyamat eredményeként megemelkedik a GSH-

termelés, amely közvetlenül azt eredményezi, hogy diamidkezelés hatására a mutáns törzs rezisztens módon viselkedik.

A *hmbB*<sup>+</sup> és *hmbBΔ* micéliumok és duzzadó konídiumok NADPH és NADP tartalmának összehasonlítása a glutationkörforgás tekintetében rávilágított arra, hogy a *hmbB*<sup>+</sup> és *hmbBΔ* micéliumok és duzzadó konídiumok NADPH-tartalma ellentmondó eredményeket adott a minták NADP-tartalmának és G6PD-aktivitásának tükrében. A *hmbBΔ* konídiumokban a NADPH mennyisége a *hmbB*<sup>+</sup> törzssel megegyező értéket mutatott, azonban a NADP mennyisége 7,9-szer magasabb, a G6PD aktivitása pedig 4,4-szeresével alacsonyabb volt a *hmbB*<sup>+</sup> konídiumokhoz képest.

A NADPH mennyisége jól korrelált a GSSG- és GSH-tartalommal, valamint a GR-aktivitással, ami alátámasztja azt a következtetésünket, hogy a konídiumok redukzív belső környezettel rendelkeznek. Azonban a vad típuséhoz hasonló NADPH-mennyiség van jelen a *hmbBΔ* duzzadó konídiumaiban, annak ellenére, hogy a G6PD-aktivitás lényegesen alacsonyabb. A glutation-körforgásba történő váratlan NADPH-betáplálás legkézenfekvőbb magyarázata vagy a pentózfoszfát útvonalon kívüli egyéb NADPH-termelő metabolikus folyamatok túlműködése (pl.: malát útvonal, izocitrát útvonal, glutamát útvonal, vagy a nemrég jellemzett 10-formil-tetrahidrofolát útvonal), vagy a NADP mitokondriumhoz kötött redukciójának fokozódása, amelyben a mitokondriális NADH és a transzhydrogenázok vesznek részt. Ezzel éppen ellentétes jelenséget figyeltünk meg a *hmbBΔ* micéliumokban. Itt annak ellenére, hogy a *hmbB*<sup>+</sup> micéliumokhoz képest a NADP-szint 3,2-szeresen megemelkedett, a G6PD pedig 3,5-szeresen megemelkedett aktivitást mutatott, a NADPH mennyisége 1,4-szeresével lecsökkent. A NADPH mennyiségének váratlan csökkenése, a glutation-körforgásból történő elszivárgása hozzájárul a *hmbBΔ* micéliumok oxidatív redox állapotának létrehozásához, a GSSG felhalmozódásához és GSH mennyiségének elégtelenségéhez. A NADPH elszivárgását okozhatja a NADPH-t igénylő metabolikus folyamatok túlműködése és/vagy a mitokondriális P450 rendszer aktivitásának fokozódása, mely utóbbi az oxigénmolekulákat egy elektronnal redukálva ártalmas szuperoxid gyökök képződését eredményezi. Ez utóbbit támasztja alá a *hmbBΔ* micéliumok magasabb szuperoxidtartalma, mely a vad típuséhoz hasonló oxigénfelvétel miatt nem származhat a légzési láncból. Ezeknek a megfigyeléseknek alapján valószínűleg a mitokondriális P450 rendszer fokozott működése felelős a *hmbBΔ* micéliumok magas szuperoxid- és alacsony NADPH-tartalmáért.

A korábbi transzkriptomikai és proteomikai vizsgálatok során azonosított, a menadionkezelés hatására kifejeződő gének *hmbBΔ* micéliumokban történő átíródása jelentősen megváltozott. Az összes GST-aktivitás megkétszereződött a *hmbBΔ* micéliumokban és a vizsgált feltételezett vagy azonosított GST-t kódoló gén kifejeződése is fokozódott a *gstB* kivételével.

Az általunk tanulmányozott összes ismert vagy feltételezett glutaredoxint kódoló gén magasabb szinten íródott át a *hmbBΔ* törzsben. Mivel a glutaredoxinok GSH-függő diszulfid-redukálók, kézenfekvő azt feltételezni, hogy ok-okozati összefüggés van a *hmbBΔ* micéliumban a glutaredoxinok fokozott átíródása és magas a GSSG-tartalom között. Emellett a glutaredoxinokat kódoló gének túlműködése jelezheti azt is, hogy a *hmbBΔ* micéliumban fennálló intracelluláris oxidatív stressz kihat a redox-érzékeny (szulfhidril csoporttal rendelkező) fehérjékre.

Érdekes módon az AspGD genomi adatbázisból véletlenszerűen kiválasztott, feltételezett GST-t vagy glutaredoxinokat kódoló gének (AN0815, AN2948, AN5831, AN6158 és AN 4215) szignifikáns túlműködést mutattak a *hmbBΔ* micéliumokban. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ezek a feltételezett GST- vagy glutaredoxin-aktivitással bíró géntermékek részt vesznek a glutation-rendszer működésében és az oxidatív stresszel szembeni védelemben, így további kutatások célpontjai lehetnek, melyek hozzájárulnának a biológiai redox folyamatok mélyebb megismeréséhez.

Az összes GR-aktivitás nem különbözött a *hmbB<sup>+</sup>* és *hmbBΔ* micéliumokban, azonban a *glrA* mRNS-ek 2,8-szeres mennyiségét mutattuk ki a mutáns törzsben a vad típushoz képest. Ennek oka lehet az enzim kifejeződésének transzláció szintjén történő szabályozása, vagy egyéb ok, pl. az enzim működését befolyásoló körülmények (pl.: poszt-transzlációs módosítás) hatása.

Az összes SOD-aktivitás megduplázódott a *hmbBΔ* micéliumokban. A SOD enzimet kódoló gének közül (*sodA*, *sodB*, *sodM*) egyedül a *sodA* kifejeződésének mértéke nőtt meg lényegesen, 2,6-szeresére. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a SodA enzim egy domináns válaszfehérje a *hmbBΔ* törzs esetében kimutatott endogén oxidatív stressz során.

Mivel a légzést az ártalmas ROS-ok folyamatos termelődése kíséri, feltételeztük, hogy a *hmbB<sup>+</sup>* és *hmbBΔ* micéliumok szuperoxid-tartalmának különbözősége a légzési

aktivitás megváltozására vezethető vissza. Nem várt eredményként közel megegyező oxigénfelvételi rátát mértünk a mutáns és vad típusok esetében a micéliumokban és a konídiumokban is. Feltételezzük, hogy a HmbB fehérje nincs befolyással a légzés aktivitására, vagy ha igen, akkor a fehérje szerepének hiánya kompenzálható más fehérjék aktivitása által. Azt, hogy a HmbB hiányában ennek ellenére növekszik a micéliumok szuperoxid tartalma, valamely a légzési lánchoz nem kötődő, szuperoxidot termelő folyamat, pl. a mitokondriális citokróm P450 rendszer fokozott működése okozhatja.

### **A HmbB szerepe az ivartalan és ivaros spórák csírázásában (Karácsony és mtsai. 2014)**

A *hmbBΔ* törzs esetében megfigyelt, a fehérje mitokondriális szerepével összefüggésbe hozható számos pleiotróp fenotípus (micéliális növekedés, morfológia, a konídiumok metabolizmusa, az oxidatív stresszel szembeni érzékenység) közül a legszembetűnőbb a HmbB fontossága a konidiospórák és aszkospórák csírázásában. A *hmbBΔ* konídiumok esetében tapasztalt, megváltozott cukor és polialkohol tartalom és metabolizmus is a konidiogenezis és csírázás folyamatának sérülésére utal a deléciós törzs esetében. Emellett a HmbB hiányában a konídiumok nagy részében drasztikusan lecsökken a mtDNS kópiaszáma, melynek mértéke teljes mértékben korrelál a konídiumok csírázóképeségével (Karácsony és mtsai. 2014). Logikus azt feltételezni, hogy ok-okozati összefüggés van a mtDNS hiánya és a konídiumok alacsony csírázóképesége között. A *hmbBΔ* konídiumokból mindemellett nem hiányoznak a mitokondriumok, amelyekről MTT és MitoTracker RedFM festéssel, valamint oxigénfogyasztásuk mérésével bizonyítottuk, hogy metabolikusan aktívak. Megállapítottuk, hogy a HmbB-fehérjék érett konídiumokban történő jelenléte a mitokondriumokban elengedhetetlen a mtDNS kópiaszámának fenntartásában (Karácsony és mtsai. 2014). A duzzadó konídiumokban fennálló mtDNS-kópiaszám és az arról átíródó mRNS-ek mennyisége közötti aránytalanság feltehetőleg a vizsgált mRNS-eknek a konidiogenezis során bekövetkező, a mtDNS szegregálódását megelőző transzkripciónak köszönhető és az mRNS-ek érett konídiumokban történő felhalmozódásának. A HmbB-GFP fehérje konidiofórokban történő eloszlása olyan események sorozatát veti fel, amelyek felelősek lehetnek a mtDNS elvesztésében a *hmbBΔ* törzs konidiogenezise során. Erős HmbB-GFP fluoreszcencia figyelhető meg a vezikulumban és a fialidokban, ahol a mitokondriumok erős felhalmozódását is megfigyeltük. Ésszerű azt feltételezni, hogy a konídiumok fialidokról történő lefűződése során a mtDNS replikáción esik át a konídiumok mitokondriumaiban, amely folyamatban a

HmbB-nek fontos szerepe van. Jelenleg nincs adat a szakirodalomban, ami bemutatná a mitokondriumok sorsát a konídiogenezis során az *Aspergillus*-okban, leszámítva néhány korai elektronmikroszkópos vizsgálatot, amely nem kifejezetten ezt a célt szolgálta, de mindenesetre igazolták a mitokondriumok vezikulumokban történő felhalmozódását. Igazoltuk, hogy a konídium csírázóképesége a *hmbBΔ* törzs esetében autonóm, nem komplementálható heterokarionokban (Karácsony és mtsai. 2014). Eredményeink mindenféleképpen arra utalnak, hogy a mtDNS szegregálódik a konídiogenezis során, de nem adnak választ arra a kérdésre, hogy a konídiogenezis melyik lépésében következik be ez a folyamat.

A HmbB fehérjének az askospórák csírázóképeségében betöltött szerepe analóg a konídiumok esetében megfigyelttel. Azonban a konídiospórák csírázóképeségével ellentétben sem a HmbB-GFP sem a GFP-HmbB fúziós konstrukció nem volt képes komplementálni az askospórák alacsony csírázóképeségét, amivel egybehangzóan azt tapasztaltuk, hogy a fúziós fehérjék az askuszoknak és askospóráknak csak kis százalékába jutnak be. Úgy tűnik, hogy a fúziós HmbB fehérje képtelen bejutni az askospórák mitokondriumaiba. Ez az eredmény bármilyen zavaró is első ránézésre, rámutat arra, hogy a mitokondriumok szegregációja az ivaros és ivartalan ciklus során eltérő módon valósulhat meg.

### **A HmbB szerepe a sterigmatocisztin szintézisében (Karácsony és mtsai. 2014)**

A *hmbBΔ* és vad típusú törzsek másodlagos metabolit-termelését vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) eljárással vizsgáltuk meg. A vizsgálat során azt találtuk, hogy a deléciós törzsek tenyészeiben rendkívül nagymértékben lecsökkent a sterigmatocisztin gombatoxin mennyisége, annak teljes hiánya sem zárható ki (Karácsony és mtsai. 2014). A hisztidin-taggelt HmbB fehérjét kifejező törzs (rekonstitúciós kontroll), valamint az N-terminális (GFP-HmbB) és C-terminális (HmbB-GFP) GFP-fúziós fehérjét kifejező törzsek esetében a sterigmatocisztin termelése helyreállt. Annak érdekében, hogy a deléciós törzseknél tapasztalható sterigmatocisztin-termelésben bekövetkezett csökkenés hátterét kiderítsük, megvizsgáltuk a sterigmatocisztin-szintézisért felelős génklaszter néhány tagjának (*afIR* klaszter-specifikus transzkripció faktor, valamint az *stcO* ketoreduktáz és *stcU* oxidoreduktáz gének) kifejeződését "standard curve" kiértékeléssel végzett qRT-PCR vizsgálattal. A *hmbBΔ* törzs esetében az *afIR*, az *stcO* és *stcU* gének szignifikánsan megemelkedett kifejeződést mutattak. A vizsgálat eredményei meglepőek, és nincsenek

összhangban a deléciós törzsek sterigmatocisztin-bioszintézisében tapasztalt jelentős visszaeséssel. Az adatokból következően elmondhatjuk, hogy a HmbB fehérje direkt, vagy indirekt módon represszálja a vizsgált gének kifejeződését, valamint, hogy egy ettől a folyamattól független útvonalon képes pozitívan is hatni a sterigmatocisztin termelődésére.

### A *hmbCΔ* törzs jellemzése

A *hmbAΔ* és *hmbBΔ* törzsek esetén alkalmazott rutin fenotípus-vizsgálatokat a *hmbCΔ* törzs esetén is elvégeztük, azonban egyik vizsgálat esetében sem kaptunk eltérést a kontroll törzshöz képest. A HmbC funkció vizsgálata további kísérletek végrehajtását igényli a jövőben.

## ÖSSZEFOGLALÁS

1. Az *A. nidulans* genomjában bioinformatikai módszerekkel 3 architektúrális HMG-box domén fehérjét (HmbA, HmbB, HmbC) azonosítottunk. A fehérjéket kódoló génekre nézve deléciós mutáns törzseket állítottunk elő, hogy segítségükkel vizsgáljuk meg a fehérjék élettani szerepét.
2. Megállapítottuk a HmbA fehérje szerepét a normális növekedési ráta fenntartásában, az alacsony pH értékhez történő adaptációban, valamint a trehalóz és sterigmatocisztin bioszintézisében.
3. A HmbB fehérje esetén végzett szerkezeti modellezéssel két, szekvencia homológia alapján nem azonosítható HMG-box domén (Shadow-HMG-box) meglétét igazoltuk a fehérje N-terminális régiójában a konzervált C-terminális HMG-boxon felül. GFP-fúziós HmbB fehérjéket kifejező törzsek felhasználásával megállapítottuk a fehérje kettős (mitokondriális és sejtmagi) lokalizációját. Ez utóbbi esetlegessége felveti specializált micéliális sejtek jelenlétét. „Western blot” vizsgálataink igazolták, hogy a fehérje a mitokondriális transzport során az N-terminális régióban elhasad.
4. Megállapítottuk, hogy a HmbB fehérje hiányában az ivartalan és ivaros spóráképző képesség és a spórák csírázóképesége is drasztikusan lecsökken. A csökkent csírázóképeség együtt járt a konídiumok megváltozott cukor és polialkohol spektrumával és a mitokondriális DNS (mtDNS) kópiaszám nagymértékű csökkenésével. A lecsökkent mtDNS mennyiségek ellenére a deléciós spórák a vad

típussal megegyező számú, működő mitokondriumot tartalmaznak. A HmbB fúziós fehérjékkel végzett komplementációs vizsgálatok rámutattak arra, hogy az ivaros és ivartalan spórák képződése során a mtDNS más-más folyamat által szegregálódik a spórákba.

5. A *hmbBΔ* törzs érzékenynek bizonyult menadion- és toleránsnak diamid oxidatív stresszágenségekkel szemben. A megváltozott oxidatív stressztolerancia hátterében eredményeink szerint a *hmbBΔ* micéliumokban jelen lévő, endogén eredetű oxidatív stressz, valamint a glutation-regenerációs ciklus komponenseinek megváltozott működése állhat.
6. Megállapítottuk, hogy a HmbB hiányában az *A. nidulans* a szintézisgének fokozott átíródása ellenére sem képes sterigmatocisztin termelésére. A sterigmatocisztin termelés és a szintézisgének átíródása közti ellentmondás azt sugallja, hogy a mikotoxin szintézise nem csak a transzkripció szintjén szabályozott, hanem a transzkripció után (transzláció/poszt-transzláció), vagy a bioszintézisben szerepet játszó faktorok szabályozásával valósul meg.

## PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Doktori munkához kapcsolódó folyóiratcikkek:

**Karácsony, Z.,** A. Gácsér, C. Vágvölgyi, C. Scazzocchio, Z. Hamari, (2014) A dually located multi-HMG-box protein of *Aspergillus nidulans* has a crucial role in conidial and ascospore germination. *Mol. Microbiol.* **94:** 383-402. **IF.: 4,419**

**Karácsony, Z.,** A. Gácsér, C. Vágvölgyi, Z. Hamari, (2015) Further characterization of the role of the mitochondrial high-mobility group box protein in the intracellular redox environment of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* **161:** 1897-1908. **IF.: 2,557**

### Egyéb folyóiratcikkek:

Galgóczy, L., L. Kovács, **Z. Karácsony,** M. Virágh, Z. Hamari, C. Vágvölgyi (2013) Investigation of the antimicrobial effect of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* **159:** 411-419. **IF.: 2,835**

**Összesített impakt faktor: 9,811**

## Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy Karácsony Zoltán szerepe meghatározó jelentőségű volt a

**Karácsony, Z.,** A. Gácser, C. Vágvölgyi, C. Scazzocchio, Z. Hamari\*, (2014) A dually located multi-HMG-box protein of *Aspergillus nidulans* has a crucial role in conidial and ascospore germination. *Mol. Microbiol.* **94**: 383-402. **IF.: 4,419**

**Karácsony, Z.,** A. Gácser, C. Vágvölgyi, Z. Hamari\*, (2015) Further characterization of the role of the mitochondrial high-mobility group box protein in the intracellular redox environment of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* **161**: 1897-1908. **IF.: 2,557**

címmel megjelent közleményekben, így az értekezésben és a publikációkban eredményeket tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk megtenni.

\*felelős szerző

.....

Dr. Hamari Zsuzsanna

Szeged, Magyarország, 2016. január 26.