

Szakdolgozat

**Egy új típusú gomba specifikus protein  
foszfatáz, a *CaPPZ1* vizsgálata**

**Készítette:**

Petrényi Katalin

III. Biológia BSc

**Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor**

Debreceni Egyetem

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Orvosi Vegytani Intézet

2010

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>4</b>
1.1. <i>Candida albicans</i> .....	4
1.2. Fehérje foszforiláció és defoszforiláció .....	5
1.3. Protein foszfatázok osztályozása .....	6
1.4. A foszfoprotein foszfatáz Z (PPZ).....	7
1.5. Protein foszfatáz Z a <i>Candida albicans</i> -ban .....	9
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>10</b>
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>10</b>
3.1. Anyagok.....	10
3.2. Táptalajok, tápoldatok.....	10
3.3. Pufferek, oldatok .....	10
3.4. Oligonukleotid primerek.....	11
3.5. Módszerek .....	12
3.5.1. <i>Candida albicans</i> tenyésztése DNS preparáláshoz .....	12
3.5.2. Genomi DNS preparálás .....	12
3.5.3. Polimeráz láncreakció .....	12
3.5.4. Agaróz gélelektroforézis.....	13
3.5.5. DNS vizsgálata restrikciós endonukleázzal.....	14
3.5.6. Southern blot.....	14
3.5.6.1. Transzfer .....	14
3.5.6.2. Prehibridizáció .....	15
3.5.6.3. Próbák előállítása .....	15
3.5.6.4. Hibridizáció.....	15
3.5.6.5. Mosás .....	15
3.5.6.6. Előhívás .....	16
3.5.7. Stressz hatások vizsgálat .....	16
3.5.7.1. Kiértékelés .....	17
<b>4. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>20</b>
4.1. Az első <i>CaPPZ1</i> allél megszakítás ellenőrzése.....	20

4.2. A második <i>CaPPZI</i> allél megszakítás ellenőrzése .....	21
4.3. A vad típusú <i>CaPPZI</i> allél eliminációjának ellenőrzése .....	22
4.4. PCR termékek ellenőrzése restrikciós emésztéssel.....	23
4.5. A génmegszakításhoz használt kazetták ektópikus beépülésének kizárása Southern blottal .....	24
4.6. Stressz hatások vizsgálata .....	25
4.6.1. A homozigóta mutáns só tűrésének vizsgálata.....	26
4.6.2. A homozigóta mutáns koffein érzékenységének vizsgálata .....	27
4.6.3. A homozigóta mutáns Hygromycin B és spermin tűrésének vizsgálata.....	28
4.7. Konklúzió .....	29
<b>5. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>30</b>
<b>6. FELHASZNÁLT IRODALOM .....</b>	<b>31</b>
<b>7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....</b>	<b>32</b>
<b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>33</b>

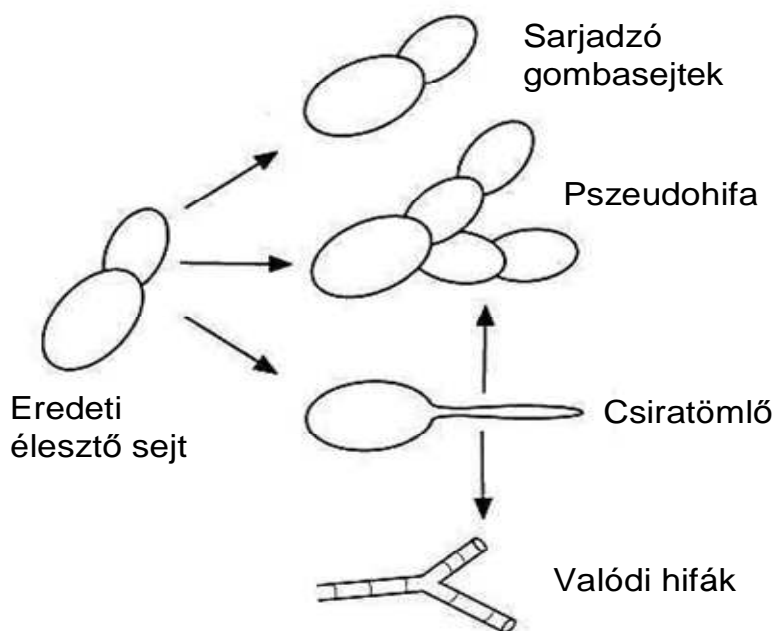
# 1. Bevezetés

## 1.1. *Candida albicans*

A sarjadzó gombák által okozott fertőzések száma jelentősen megnövekedett az utóbbi két évtizedben. Közülük legvirulensebb a *Candida albicans*, amely a fertőzések 60-70 %-ért felelős.

A *C. albicans* egy opportunista patogén gomba, amely egészséges immunrendszerű szervezetben is megtalálható a légutak, a gastrointestinalis traktus és a női nemi szervek nyálkahártyáján. Az ép immunrendszerű szervezetben csak ritkán okoz megbetegedéseket, ebben az esetben valamilyen helyi tényező miatt borul fel az egyensúly a természetes flóra és a *C. albicans* között. Az ilyen betegségek gyors és enyhe lefolyásúak, de predisponáló tényezők hatására súlyos kórfolyamatot indíthatnak el.

A szisztémás fertőzés legyengült immunrendszerű betegeknél figyelhető meg, de megjelenhet baktérium flóra elnyomása esetén is (tartós antibiotikum kezelés). A legyengült immunrendszer okai az alacsony születési súly, a szervezet leromlott állapota (éhezés, öregedés), sugárterápia illetve a HIV vírus által okozott fertőzés. Egyes terápiás beavatkozás során immunszupresszált állapotot alakítanak ki szervátültetés, és autoimmun betegeknél, ami elősegítheti a *Candida* fertőzést.



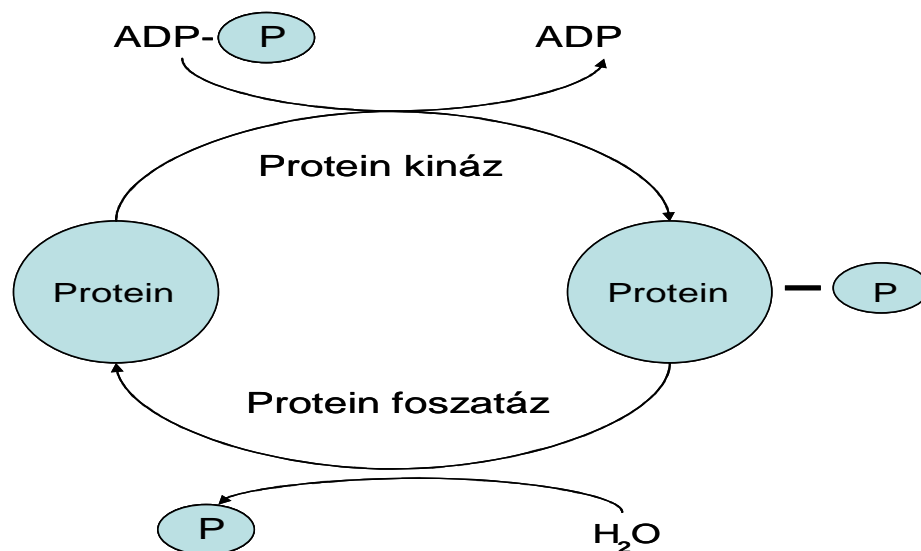
1. ábra. *Candida albicans* morfológiája

A *C. albicans* alakjai közül valószínűsíthetőleg a hifa forma, ami okozza a kóros folyamatot (1. ábra). Leggyakrabban az egysejtű, élesztő formát szokták diagnosztizálni a klinikai anyagokból, de súlyosan immunszuppresszált betegek esetén gyakorta megfigyelhető a hifa forma is.

A fertőzéseket okozó speciestek között egyre gyakoribb az antimycoticus szerekkel szembe primer illetve a szekunder rezisztenciát mutató izolátumok száma. Az antimycoticus szerek két fő csoportba sorolhatóak: a membránkárosító szerek (polyenek, azolok, triazolok) és sejtfal szintézist gátló anyagok (lipopeptidek). A fertőzések növekvő száma (főleg immunhiányos betegekben), illetve az alkalmazott antimycoticumokkal szemben kialakuló rezisztenciák indokolják, hogy az eddig ismertektől eltérő hatásmechanizmusú gyógyszereket fejlesszünk ki. Jelátviteli terápia során olyan regulátor enzimek a célpontok, amelyek fehérjehálózati csomópontok. Protein kinázokra tervezett gátló molekulák már ismertek. Elvileg a protein foszfatázok is célpontok lehetnek jelátviteli terápia céljából. Új célpontként merült fel a kizárólag gombákban előforduló esszenciális enzim, a protein foszfatáz Z (PPZ).

## 1.2. Fehérje foszforiláció és defoszforiláció

Eukarióta sejtekben jelentős szabályozó szerepet tölt be a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja (fehérjékészletük 30%-a foszforilálódhat). A regulációban egyformán fontos szerepet töltenek be a protein foszfatázok és a protein kinázok (2. ábra).

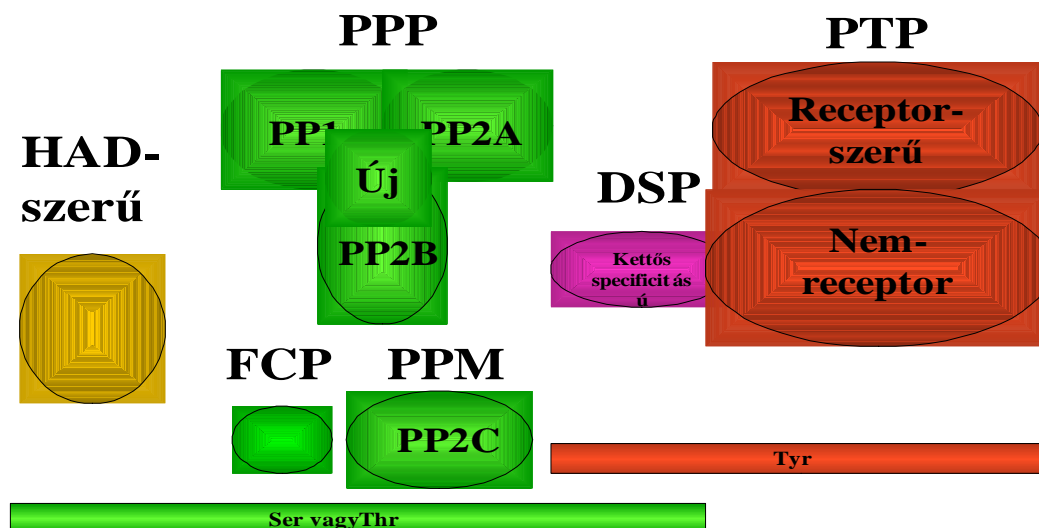


2. ábra. A fehérje foszforilációja és defoszforilációjának mechanizmusa

A fehérjék szerin treonin illetve tirozin oldalláncaiba ATP, ritkább esetben GTP gamma foszfátja épül be a foszforilációs reakció során. Az ilyen posztszintetikus módosításokat a protein kinázok katalizálják. A hisztidin foszforilációja ritkább módosításnak számít, amelyet kétkomponensű regulációs enzimrendszerek katalizálnak. Ezek a foszforilációs módosítások akkor töltnek be a sejten belül jelentős szerepet, ha lehetőség nyílik a beépített foszfát lehasítására (2. ábra). Genetikai, molekuláris biológia és sejtbiológiai kísérletekkel igazolták, hogy a protein foszfatázok jelentős szerepet töltenek be különböző fiziológiai folyamatokban, így például részt vesznek anyagcsere folyamatokban, fehérje és nukleinsav szintézisben, sejtciklus, apoptózis, jelátvitel, immunválasz, a sejtek mozgása, izom-összehúzódás, idegműködés szabályozásában illetve olyan bonyolult folyamatokban is mint a memória kialakulása (Dombrádi, 1997). Kinázokat jobban ismerik ezért célunk a kevésbé jellemzett foszfatáz oldal vizsgálata.

### 1.3. Protein foszfatázok osztályozása

A protein foszfatázok több enzimes családba sorolhatóak reakciómechanizmusok és katalitikus alegységük szerkezete alapján (3. ábra). Külön csoportot alkotnak a Ser/Thr, és a Tyr oldalláncokra specifikus foszfatázok (Hunter, 1995). A Ser/Thr specifikus foszfatázok három csoportba sorolhatóak. Így megkülönböztetünk foszforprotein foszfatázokat (PPP), fémion-függő protein foszfatázokat (PPM), és RNS polimeráz II C-terminális régiójára specifikus foszfatázokat (FCP).

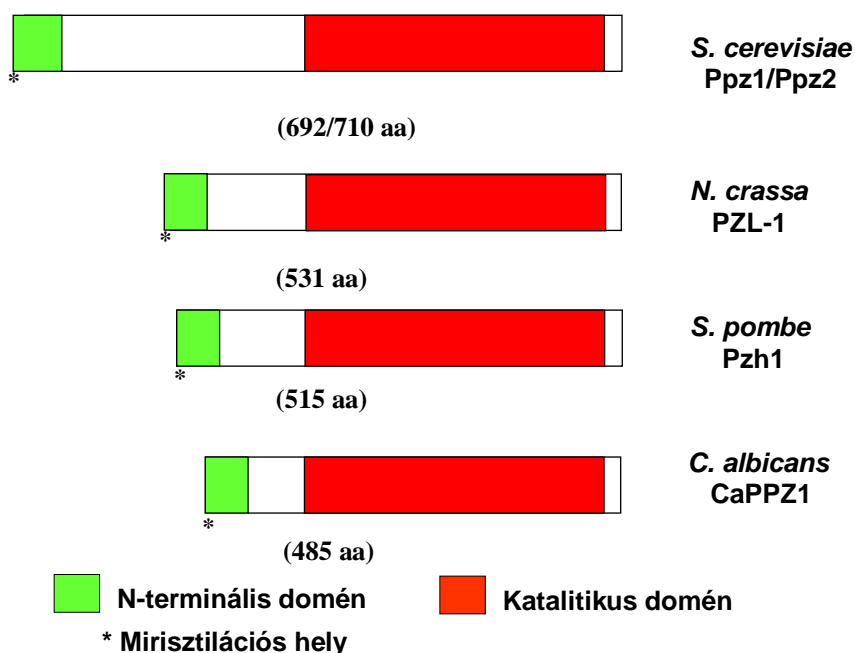


3. ábra. Az eukarióta protein foszfatázok osztályozása

A HAD szerű foszfatázok reaktív Asp oldallánc segítségével segítik elő a foszfát csoport hidrolízisét. A proteinek foszfortirozin oldalláncát a Tyr-specifikus protein foszfatázok defoszforilálják. A folyamatban egy esszenciális Cys oldallánc vesz részt. Ebbe a csoportba sorolható a receptorszerű és a nem receptorszerű protein tirozin foszfatázok (PTP) illetve a széles specifikus vagy más néven kettős specificitású foszfatázok csoportja (DSP) amelyek, egyaránt képesek a tirozin oldalláncok mellett szerin és treonin oldalláncokat is defoszforilálni (Barford, 1995).

#### 1.4. A foszfoprotein foszfatáz Z (PPZ)

A legkorábban felismert PPP családba tartoznak a PP1, PP2A, PP2B (Ingebritsen és Cohen, 1983) illetve az ezek között átmenetet mutató új típusú foszfatázok (Dombrádi, 1997). A PP1 aktivitását inhibitor-1, inhibitor-2 és hőstabil fehérjék gátolják, ezzel szemben a 2-es típusú foszoprotein foszfatázt (PP2) nem gátolják. Az utóbbi enzimescsoport tovább osztályozható: önmagában aktív PP2A,  $Ca^{2+}$ -függő PP2B, illetve  $Mg^{2+}$  függő PP2C enzimekre. Az új típusú foszfoprotein foszfatázok csoportjába tartozik a protein foszfatáz Z (PPZ), amely csak gombákban fordul elő jellemző, hogy aminosav sorrendje három részre bontható (4. ábra).



4. ábra. A PPZ fehérjék elsődleges szerkezetének összehasonlítása

A *Schizosaccharomyces cerevisiae*-ben kettő, ezzel szemben a *Schizosaccharomyces pombe*-ben, *Neurospora crassa*-ban és *Candida albicans*-ban csak egy gén kódolja. A *S. cerevisiae*-ben a *PPZ1* gén terméke domináns szemben a *PPZ2*-vel bár a *PPZ1*-el megegyező funkciót tölt be. A négy gombából kimutatott öt géntermékre egyaránt. Így van egy C terminális katalitikus domén (piros szakasz), és N terminális végén található kb. 50 aminosavból álló peptidszakasz (zöld szakasz), amelyekről elmondható, hogy mindkét egység nagyban hasonló az 5 fehérjében. A harmadik egység a N terminális többi része (fehér szakasz), amely különbözik az öt géntermékben, mert eredendően egy rendezetlen része a fehérjének. A C terminális nagyban hasonlít a protein foszfatázok 1. típusú katalitikus alegységéhez, ezért 1. típusú Ser/Thr foszfatázok közé tartozik a PPZ. Funkciójukat tekintve a C terminális felelős az enzim aktivitásáért, az 50 aminosavból álló peptidszakasz pedig valószínűleg az N terminális mirisztilálásához szükséges. A külön expresszált katalitikus domén nagyobb aktivitással rendelkezik, mint a teljes hosszúságú fehérje (Posas, 1995). A Hal3 regulátor alegység gátolja a foszfatáz aktivitását, úgy hogy a C terminális katalitikus alegységét köti meg (de Nadal és mtsai, 1998). Tehát a Hal3p túltermeltetése a PPZ inaktiválásával azonos következményekkel jár.

További kutatások kiderítették, hogy a PPZ felelős az élesztő sejtek ozmotikus stabilitásáért, így a sejtek méretét és integritását is befolyásolja. A sejt integritásának kialakításában szerepet játszik a PPZ és a C protein kináz által aktivált mitogén protein kináz (MAP) útvonal (Lee és mtsai, 1993). A PPZ hiányos mutáns Na és Li ionnal szembeni toleranciáját is megfigyelték, amelyet azzal magyaráznak hogy a PPZ az ENA1 gén expresszióját és az általa kódolt P típusú Na<sup>+</sup>-ATPáz aktivitásának gátlásával csökkenti a Na<sup>+</sup> effluxot (Posas és mtsai, 1995). A további kutatások kétségbe vonják a PPZ jelentőségét a nátriumion homeosztázis szabályozásában. Sokkal inkább úgy gondolják, hogy a TRK1, 2 kálium transzport rendszert szabályozza, úgy hogy a PPZ hiányos sejtek káliumion influxa megnő (Yenush és mtsai, 2002). A sejtosztódás szabályozásában is szerepet játszik, mégpedig az esszenciális foszfatázzal (SIT4) ellentétes feladatot lát el. SIT4 és HAL3 hiányos sejtek a G1 fázisból nem lépnek tovább, mert a PPZ G1/S átmenet során gátlást fejt ki (Clotet és mtsai, 1999). A PPZ felelős a PKC protein kináz által közvetített jelátvitelben (Lee és mtsai, 1993), és fontos a fehérje szintézisben (Nadal és mtsai, 2001). Továbbá a PPZ hiányos sejtek érzékenyebbé váltak kis koncentrációjú koffeinre.

A PPZ inaktiválása hőérzékeny lassú növekedést okozott. A PPZ hiányos sejtek TRK 1, 2 aktivitása megnő, ami káliumion beáramláshoz vezet. A megnövekedett káliumion koncentráció miatt megváltozott nyomás és ionegyensúly, ami a hidrogénion kiáramlását



stimulálja. Az előbb említettek miatt megemelkedett a pH és alkalikus sokk alakult ki. A sejten belüli pH növekedés több változást is előidézhethet, így például módosíthatja a génextpressziót, illetve hozzájárulhat a sejtciklus szabályozásának megbomlásához, illetve a fehérjeszintézis hibáihoz is. Továbbá a PPZ hiányos sejtek érzékenyebbé váltak kis koncentrációjú koffeinre. A mutáció másodlagos hatása lehet a PKC jelátviteli útvonal módosítása, amely sejtfal szintézis gátláshoz vezet. Ez magyarázhatja a PPZ hiányos sejtek érzékenységét kis koncentrációjú koffeinre

### **1.5. Protein foszfatáz Z a *Candida albicans*-ban**

A *Candida albicans*-ban egy protein foszfatáz gén (*CaPPZ1*) található (lásd 4. ábra). A gén jelentős szekvencia polimorfizmust mutat (Kovács és mtsai, 2010). Ez a genetikai változatosság valószínűleg a diploid gomba aszexuális szaporodásából adódik. Az általunk vizsgált SN87 törzs DNS szekvenálása megmutatta, hogy *CaPPZ1*-re nézve homozigóta, csak a *CaPPZ1-1* allélt tartalmazza. A *Candida albicans*-ban betöltött szerepét a gén megszakításával kívántuk tanulmányozni. Mivel ez a gomba diploid genommal rendelkezik, ezért a gén két alléljének kiütését két homológ rekombináción alapuló lépésben hajtottuk végre (Yvonne Schaub és mtsai, 2006). A kísérlet során hisztidin és leucin auxotrófiát mutató törzset (SN87) használtunk fel.

Az első allél megszakítása *His1* géntartalmú kazettával történt. A *His1* gént tartalmazó vektorral (pFA-CdHIS1) és a *CaPPZ1* nem kódoló szakaszokkal kiegészített primerpárokkal végzett PCR reakció során olyan integrációs kazettákat állítottunk elő, amelyekben a *CaPPZ1* gén nem-kódoló szakaszai közre fogják a *His1* gént (*His1PPZ1*). A gén megszakításához a *His1PPZ1* kazettával transzformáltuk az auxotróf törzset és hisztidin mentes táptalajon szelektáltuk.

A második allél megszakításához a heterozigóta mutáns törzset (első *CaPPZ1* allél *His1* génnel megszakított törzs) használtuk fel. A gén megszakítása a fentiekhez hasonló módon történt, a leucin auxotrófiát komplementálni képes *Leu2* gén használatával. *Leu2* gént tartalmazó vektorral (pFA-CmLEU2) és a *CaPPZ1* nem kódoló szakaszokkal kiegészített primerpárokkal végzett PCR során a *Leu2PPZ1* integrációs kazettát kaptunk, amellyel transzformáltuk a sejteket, majd hisztidin leucin mentes minimál táptalajon szelektáltuk.

## 2. Célkitűzések

Munkám során heterozigóta és homozigóta *CaPPZI* deléciós mutánsokkal illetve a kontroll törzssel dolgoztam. Célul tűztük ki:

- A génmegszakítás sikerének ellenőrzését, PCR és Southern blot kísérletekkel.
- A gén deléció hatásának kimutatását, a kontroll és a mutáns törzs stressz hatású anyagokra való érzékenységének vizsgálatával.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. Anyagok

A kísérletekben felhasznált vegyszerek többségét a Spektrum 3D-től szereztük be. A továbbiakban megadom az ettől eltérő beszerzési forrásokat. Fermentas: Taq DNS polimeráz, 10× Taq puffer (MgCl<sub>2</sub> nélkül), MgCl<sub>2</sub>; Promega: restrikciós enzimek *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*; Roche: DIG DNA Labeling and detection kiset (11093657910); Difco: nitrogén alapú élesztő aminosav nélkül, élesztő kivonat, pepton; Reanal: β-merkaptotanol; Bio-Rad: agaróz és alacsony olvadáspontú agaróz.

### 3.2. Táptalajok, tápoldatok

YPD komplett szilárd táptalaj: 1% élesztő kivonat, 2% pepton, 2% glükóz, 1,5% agar

YPD komplett folyékony táptalaj: 1% élesztő kivonat, 2% pepton, 2% glükóz

SD minimál szilárd táptalaj: 0,67% nitrogén alapú élesztő aminosav nélkül, 2% glükóz, 1,5% agar

SD minimál folyékony táptalaj: 0,67% nitrogén alapú élesztő aminosav nélkül, 2% glükóz

SD+leucin minimál szilárd táptalaj: 0,67% nitrogén alapú élesztő aminosav nélkül, 100 µg/ml leucin, 2% glükóz, 1,5% agar

SD+leucin minimál folyékony táptalaj: 0,67% nitrogén alapú élesztő aminosav nélkül, 100 µg/ml leucin, 2% glükóz

### 3.3. Pufferek, oldatok

Kivonó puffer (DNS izoláláshoz): 50 mM Tris, 50mM EDTA, 2% SDS, és frissen hozzáadva 1% β-merkaptotanol (pH 8.0)

RNáz: 10 mg/ml törzsoldat

Proteináz K: 10 mg/ml törzsoldat

hering sperma DNS:10mg/ml oldat

6× DNS mintapuffer: 66,6% szaharóz, 0,416% brómfenolkék, 10x TAE-puffer 25 ml oldatban

1× TAE puffer: 40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 8.0

BSA: 10 µg/ml törzsoldat

Alsó gél (10%-os): H<sub>2</sub>O (4 ml), 30% akrilamid és 0,8% bis-akrilamid(3,3 ml), 1,5 M Tris-HCl (pH8) 0,4% SDS(2,5 ml), TEMED(0,008 ml), 10%-os AMPER(0,1 ml)

Felső gél: H<sub>2</sub>O(2,1 ml), 0,5M Tris-HCl 0,4% SDS(0,38 ml), 10% AMPER(0,03 ml), TEMED(0,006 ml)

10×PBS (pH 7.4): 35,6 g dinátrium-hidrogén-foszfát, 61,5 g NaCl 1000 ml-re kiegészítve

1× Transzfer: 150 ml 5× Transzfer, 150 ml metanol, 450 ml steril víz

TBST: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100, pH 7.5

TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5

Mosó puffer: 0,1 M Maleinsav, 0,15 M NaCl, pH 7,5 (20°C); 0,3% (v/v) Tween 20

Maleinsav buffer: 0,1 M Maleinsav, 0,15 M NaCl, pH 7.5 (NaOH-dal van beállítva a pH 20°C-on)

Érzékelő puffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9.5 (20°C)

TE buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (20°C)

### 3.4. Oligonukleotid primerek

A következő ITD által szintetizált oligonukleotidokat a BioScience Kft-től rendeltük.

#### A *CaPPZ1* 1. allél megszakítás (*his1*) ellenőrzéséhez

CaPPZ upper-X3-*his1*: 5'-CGCAACAGATATATTGGTGC-3'

CaPPZ lower-X2-*his1*: 5'-TAAACTGTATATCGGCACCG-3'

CaPPZ upper-1U: 5'-CGTTGTGTAATGGCTAGGAG-3'

CaPPZ lower-1L: 5'-GTACTTGATGCTATGGTATCGG-3'

#### A *CaPPZ1* 2. allél megszakítás (*leu2*) ellenőrzéséhez

CaPPZ upper-G4-*leu2*: 5'-ACA CAA GGA CTG GCA CAC GCA C-3'

CaPPZ lower-G1-*leu2*: 5'-CCT GTT GTT GCT GAT GCA CCT GCT G-3'

CaPPZ upper-X3-*leu2*: 5'-GTT GGT GAC GCG ATT GTC GAA GCT G-3'

CaPPZ lower-X2-*leu2*: 5'-CGG TAC CGA CGT GAT CAC CTG GTA-3'

#### Egyéb *CaPPZ1* specifikus primerek

5U: 5'-ATC CTT TAG ATA GTG CTG C-3'

2L: 5'-TAG ATA TTT TTG GTC CGT GTG C-3'

## 3.5. Módszerek

### 3.5.1. *Candida albicans* tenyésztése DNS preparáláshoz

Vizsgálataink során kontrollként hisztidin és leucin auxotrófiát mutató *Candida albicans* (SN87) törzset használtunk fel, amit Dr. Suzanne M. Noble (Noble, 2005) biztosított számunkra. A heterozigóta és homozigóta CaPPZ1 deléciós mutánst Ádám Csaba állította elő a DE OEC Orvosi Vegytani Intézetében. A törzset szilárd táptalajon tenyésztettük (2-3 napig) 37°C-on. A kontroll törzset komplett táptalajon (YPD), a heterozigóta mutáns törzset hisztidin mentes minimál táptalajon (SD+leucin), a homozigóta mutánst pedig hisztidin leucin mentes minimál táptalajon (SD) tenyésztettük. A kinőtt telepekből 1-1 telepet 5-5 ml YPD tápoldatba oltottuk le. Az élesztősejteket 16 óráig 37°C-on tenyésztettük majd ezeknek a sejteknek 100 µl-ét oltottuk 20 ml YPD táptalajba és tenyésztettük 8 órán keresztül. A mintát centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk majd a mintát PBS-sel mostuk. A kapott sejtuszpenziót folyékony nitrogénbe lefagyasztottuk majd -70°C-on tároltuk.

### 3.5.2. Genomi DNS preparálás

A lefagyasztott gombamintát spatulával eldörzsöltük és 500 µl kivonó pufferrel szuszpendáltuk fel. A szuszpenzióhoz RNáz A-t adtunk úgy hogy a végkoncentráció 100 µg/ml legyen majd inkubáltuk a mintát 37°C-on 30 percig és ezt követően a minta proteináz K kezelése következett (100µg/ml végkoncentrációban alkalmazva) 1 órán keresztül 55°C-on. A kivonattal kétszer elvégeztük a fenol-kloroformos (1:1) extrakciót. A felső vizes fázist új eppendorf csőben pipettáztuk, abszolút etanol és NaCl (200 mM végkoncentrációban) jelenlétében kicsaptuk a DNS-t. A DNS pelletet 70%-os etanollal mostuk majd, vákuum centrifugában szárítottuk. Steril vízbe oldottuk egy éjszakán át. A DNS koncentrációjának és tisztaságának vizsgálatát fotometriás módszerrel végeztük.

### 3.5.3. Polimeráz láncreakció

A DNS polimeráz láncreakciók során Taq DNS polimerázt használtunk (Fermentas). A hibridizálási hőmérséklete a primerek T<sub>m</sub> értéke alatt 1-3°C-kal volt. A PCR reakciókat agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

**1. táblázat. Egy tipikus reakció összetétele:**

	koncentráció	25µl végtérfogat
Steril víz	-	15,3 µl
10× Taq puffer	1×	2,5 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	3mM	3 µl
10mM dNTP	0,2mM	0,5 µl
Primer I 5mM	0,25mM	1,25 µl
Primer II 5mM	0,25mM	1,25 µl
Genomi DNS 0,3µg	-	1 µl
TaqDNS polimeráz 5u/µl	1u/µl	0,2 µl

**2. táblázat. A különböző primerpárokkal végzett kísérletek hőmérsékleti profilja**

Lépések	1U-1L		1U-X2his és X3his-1L		G1leu-X2leu és X3leu-G4leu		5U-2L	
	Hőmérséklet	idő	hőmérséklet	Idő	hőmérséklet	idő	hőmérséklet	Idő
1.	97 °C	180sec	97 °C	180sec	97 °C	180sec	97 °C	180sec
2.	57 °C	30sec	54 °C	30sec	68 °C	30sec	54 °C	30sec
3.	72 °C	180sec	72 °C	60sec	72 °C	60sec	72 °C	60sec
4.	92 °C	20sec	92 °C	20sec	92 °C	20sec	92 °C	20sec
5.	2-4. lépés ismétlése 30 cikluson keresztül							
6.	57 °C	30sec	54 °C	30sec	68 °C	30sec	54 °C	30sec
7.	72 °C	600sec	72 °C	600sec	72 °C	600sec	72 °C	600sec
8.	4 °C	tárolás	4 °C	Tárolás	4 °C	tárolás	4 °C	tárolás

**3.5.4. Agaróz gélelektroforézis**

A genomi DNS preparálás illetve a PCR reakciók során kapott termékeket vizsgáltuk agaróz gélelektroforézissel. A DNS fragmentumokat 1%-os agaróz gélen választottuk el. Az agarózt 1× TAE pufferbe oldottuk fel többszöri forralással. A kéz-melegre hűtött oldathoz ethidium-bromidot (10µl/100ml) adtunk a DNS fragmentek láthatóvá tételének érdekében, ezután az öntőkeretbe öntöttük.

A DNS mintákhoz 6× DNS mintapuffert adtunk úgy, hogy 1×re híguljon. A megszilárdult géltre vittük fel a mintákat. A futtatás 1× TAE pufferben történt 80-100V feszültség mellett 1 órán keresztül. A standard általában 1kb vagy 100bp DNS létra volt (Invitrogen).

### 3.5.5. DNS vizsgálata restrikciós endonukleázzal

A genomi DNS restrikciós kezelését a Southern blot vizsgálathoz készítettük elő. Az emésztés során készítettünk egy reakció közeget, amelyben a vizsgálni kívánt DNS-t inkubáltuk 2 órán keresztül 37°C-on majd agaróz gélelektroforetikus vizsgálattal ellenőriztük. A reakcióelegy tartalmazza az emésztési kívánt DNS-t, a restrikciós endonukleázt az enzimhez tartozó 10× puffert BSA-t, amit steril desztillált vízzel egészítettük ki a végtérfogatra.

### 3. táblázat. Egy tipikus reakcióelegy összetétele

	Végtérfogat 20 µl
Steril víz	15,8 µl
10× puffer	2 µl
DNS	1 µl
BSA	0,2 µl
Enzim	1 µl

### 3.5.6. Southern blot

A génmegszakítás ellenőrzése céljából végeztük el a Southern blot kísérletet, annak bizonyítására, hogy a megszakító kazetták csak egy, a megfelelő helyre épültek be. *EcoRI*, *HindIII* és *BamHI* restrikciós enzimekkel emésztettük a DNS mintákat.

#### 3.5.6.1. Transzfer

A restrikciós enzimekkel egy éjszakán keresztül emésztett DNS mintákat 1%-os agaróz gélen választottuk el, 1× TAE puffer rendszerben. A depurinálás során 250 mM-os HCl oldattal 10 percen át rázattuk, majd a denaturálás 1,5 M-os NaCl és 0,5 M-os NaOH-os közegben történt 30 percen keresztül. A neutralizálás 30 percig tartott az alábbi oldatban: 1 M Tris HCl, 1,5 M NaCl, 0,1 M EDTA (pH 8.0). A transzfer, vákuum blottoló készülék segítségével Hybond N+ membránra történt 90 percen keresztül, 250-400 Hgmm vákuum alatt. A transzfer közben 10× SSC oldattal tartottuk nedvesen a membránt. Az átblottolt DNS-t 80°C-on 30percig

hevítettük, majd keresztkötéseket alakítottunk ki két ciklust alkalmazva 245 nm hullámhosszú 1200  $\mu\text{J}/\text{cm}$  energiájú UV fénnel.

#### **3.5.6.2. Prehibridizáció**

A membrán aspecifikus kötőhelyeinek telítése és a próbával nem megegyező targetek lefedés miatt végeztük el a prehibridizációt.

#### **4. táblázat. A prehibridizációs oldat összetétele**

Törzsoldat	Közeg	20 ml végtérfogat
1% BSA	1%(m/v)	0,2 g
Steril víz	-	3 ml
1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 M	10 ml
20% SDS	7%(m/v)	7 ml
0,5 M EDTA	1 mM	40 $\mu\text{l}$

A prehibridizációs oldathoz használat előtt 20 ml-be 200  $\mu\text{l}$  hering sperma DNS-t tettünk majd 5 perces forralás után az oldatot a membránnal hibridizációs csőbe tettük. A prehibridizáció 3 órán keresztül 50°C-on végeztük.

#### **3.5.6.3. Próbák előállítása**

A Southern blot során DIG DNA Labeling and detection kitet (Roche 11093657910) használtunk. A His próbához his lower-his upper primereket, a Leu próbához leu lower-leu upper primereket használtunk. Mindkét esetben a szelekciós markert tartalmazó plazmid volt a target DNS. His illetve Leu próba készítése során felhasználtunk 14  $\mu\text{l}$  PCR terméket. A PCR termékek 10 percig való forralás majd lehűtése után, hexanukleotid mixet (5. cső), dNTP jelölő mixet (6. cső), upper primert (His próbához his upper, Leu-hoz leu upper) és kivonó enzimet (7. cső). A próbát használat előtt egy éjszakán keresztül 37°C-on inkubáltuk.

#### **3.5.6.4. Hibridizáció**

A hibridizálás során az általunk keresett génre (*His1* és *Leu2*) specifikus próbát öntöttünk. A hibridizációs (His illetve Leu) próbát 5 perc forralás, majd hűtés után lehetett hozzáadni a prehibridizációs oldatot tartalmazó membránhoz. A próbával egy éjszakán keresztül 50°C-on, a cső állandó forgatása mellett végeztük a hibridizációt.

#### **3.5.6.5. Mosás**

A feleslegben lévő próba eltávolítása érdekében mostuk a membránt.

### 5. táblázat. A mosó oldat összetétele

	250 ml
1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 ml
20% SDS	12,5 ml
0,5 M EDTA	0,5 ml
Steril víz	227 ml

A membránt a fent leírt oldattal mostunk kétszer 20 percig, 54°C-on.

#### 3.5.6.6. Előhívás

A Southern blot előhívását DNA Labeling and detection kitet (Roche 11093657910) kittel végeztük az alábbi lépések szerint:

### 6. táblázat. A Southern blot előhívásának lépései

Lépés	Inkubálási idő, oldat
1	1-5 percig mosó puffer
2	30 percig 100ml blokkoló oldat (10× blokkoló oldat 1×-re kihígítása maleinsav pufferrel)
3	30 percig 20ml antitest oldat (Anti-Digoxigenin-AP (8-as cső) 5 percen keresztül 10000rpm-en centrifugálva, majd 5000×-re kihígítani a blokkoló oldattal)
4	2×15 perc 100ml mosó puffer
5	2-5 perc 20ml érzékelő puffer
6	16 óráig festék szubsztrát oldat (200µl NBT/BCIP (9-es cső) 10 ml érzékelő pufferbe oldva)
7	TE pufferrel történő mosás után a membránt lefényképeztük

Az eredmény rögzítésére Alpha Innotech FluorChem FC2 műszert használtunk.

#### 3.5.7. Stressz hatások vizsgálat

A kontroll és a homozigóta mutáns törzseket először szilárd táptalajon tenyésztjük (2-3 napig) 37°C-on. A kontroll törzset komplett táptalajon (YPD), a homozigóta mutánst pedig hisztidin leucin mentes minimál táptalajon (SD) tenyésztjük. A kinőtt telepekből 1-1 telepet 5-5ml YPD tápoldatba oltottuk le. Az élesztősejteket 24 óráig 37°C-on tenyésztjük. A gomba szuszpenziót 10× hígítás után 620nm-en fotometriásan mértük. Az abszorbancia értéket figyelve hígítottuk az oldatot úgy, hogy a fényelnyelés értéke 0,0005 legyen. A lemezre (96 lyukú lemez) üregenként 200-200µl vittünk fel, úgy hogy a gombaszuszpenzió tartalmazza a különböző stressz hatású anyagot a megfelelő koncentrációban. Kontroll törzsből 2 telepet oltottunk le és a homozigóta mutánsból (*ppz1 KO*) is 2 telepet oltottunk le. Minden telepből 3-3



párhuzamos mérést készítettünk. A platet 16 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Majd 620nm-en mértük (Thermo LabSystems, multiskam RC reader-rel) az abszorbancia változást így nyomon követve vizsgáltuk a növekedést.

**7. táblázat A koffein hatás vizsgálatának sémája**

Lyuk	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Minta	Kontroll-1			Kontroll-2			ppz1 - 1 KO			ppz1 - 2 KO		
A	YPD-vel 0,0005-re hígított gomba szuszpenzió											
B	1mM-os koffeinnel 0,0005-re hígított gomba szuszpenzió											
C	2,5mM-os koffeinnel 0,0005-re hígított gomba szuszpenzió											
D	5mM-os koffeinnel 0,0005-re hígított gomba szuszpenzió											
E	7,5mM-os koffeinnel 0,0005-re hígított gomba szuszpenzió											
F	15mM-os koffeinnel 0,0005-re hígított gomba szuszpenzió											
G	YPD kontroll											

### 3.5.7.1. Kiértékelés

A 16 órás növekedés után a 620nm-en mért OD értékekkel végeztük a számításokat. Az értékeket Excell táblázatba illesztettük (8. táblázat). Az YPD kontrollnál (G sorban) mért értékeket levontuk a gomba szuszpenzióknál mért értékekből. Így megkaptuk a növekedés fényelnyelésének értékét a tápfolyadék fényelnyelésének levonásával (9. táblázat). A három párhuzamos értékből átlagot és szórást számoltunk (10. táblázat). A következő lépésben pedig gomba kontrollt (A sor) 100%-nak vettük és ehhez viszonyítva számoltunk százalékos értékeket. A két párhuzamos leoltás átlagát és szórását számoltuk ki majd az előbb leírt módon százalékos értékeket számoltunk (11. táblázat) és ezekből az értékekből készítettünk diagramot. A kiértékelést a koffein hatás vizsgálatán keresztül mutatom be.

**8. táblázat. A mért értékek beillesztése a táblázatba**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,061	1,056	0,948	0,922	0,917	1,031	0,957	0,962	0,952	1,04	1,02	1,038
B	1,099	1,107	1,065	1,034	1,083	1,002	0,894	0,919	0,869	0,928	1,006	1,02
C	0,948	0,953	0,989	0,947	0,914	0,944	0,413	0,412	0,41	0,448	0,462	0,449
D	0,465	0,455	0,461	0,399	0,354	0,408	0,086	0,091	0,088	0,097	0,104	0,101
E	0,175	0,173	0,176	0,139	0,144	0,146	0,073	0,07	0,072	0,072	0,078	0,085
F	0,105	0,099	0,103	0,093	0,095	0,096	0,063	0,063	0,064	0,072	0,065	0,069
G	0,062	0,061	0,062	0,062	0,06	0,065	0,063	0,061	0,061	0,059	0,061	0,064

**9.táblázat. YPD kontroll levonásával korrigált értékek**

	kontroll-1			kontroll-2			Ppz1 – 1 KO			ppz1 - 2 KO		
YPD	0,999	0,995	0,886	0,860	0,857	0,966	0,894	0,901	0,891	0,981	0,959	0,974
1,0	1,037	1,046	1,003	0,972	1,023	0,937	0,831	0,858	0,808	0,869	0,945	0,956
2,5	0,886	0,892	0,927	0,885	0,854	0,879	0,350	0,351	0,349	0,389	0,401	0,385
5,0	0,403	0,394	0,399	0,337	0,294	0,343	0,023	0,030	0,027	0,038	0,043	0,037
7,5	0,113	0,112	0,114	0,077	0,084	0,081	0,010	0,009	0,011	0,013	0,017	0,021
15,0	0,043	0,038	0,041	0,031	0,035	0,031	0,000	0,002	0,003	0,013	0,004	0,005

**10. táblázat. A három párhuzamos mérés átlaga és szórása**

	kontroll-1		Kontroll-2		ppz1 KO		ppz1 -2 KO	
	átlag	Szórás	Átlag	szórás	Átlag	szórás	átlag	szórás
Gomba kontroll	0,960	0,064	0,894	0,062	0,895	0,005	0,971	0,011
1,0	1,029	0,023	0,977	0,043	0,832	0,025	0,923	0,047
2,5	0,902	0,022	0,873	0,016	0,350	0,001	0,392	0,008
5,0	0,399	0,005	0,325	0,027	0,027	0,004	0,039	0,003
7,5	0,113	0,001	0,081	0,004	0,010	0,001	0,017	0,004
15,0	0,041	0,003	0,032	0,002	0,002	0,002	0,007	0,005

**11.táblázat. A három párhuzamos átlagának és szórásának százalékos értéke**

	kontroll-1		kontroll-2		ppz1 KO		ppz1 -2 KO	
	Átlag (%)	Szórás (%)	Átlag (%)	Szórás (%)	Átlag (%)	Szórás (%)	Átlag (%)	Szórás (%)
0,0	100,0	6,412	100,0	6,208	100,0	0,513	100,0	1,124
1,0	107,2	2,268	109,3	4,325	93,0	2,503	95,1	4,737
2,5	93,9	2,214	97,6	1,644	39,1	0,100	40,3	0,833
5,0	41,5	0,451	36,3	2,673	3,0	0,351	4,0	0,321
7,5	11,8	0,100	9,0	0,351	1,1	0,100	1,8	0,400
15,0	4,2	0,252	3,6	0,231	0,2	0,153	0,8	0,493

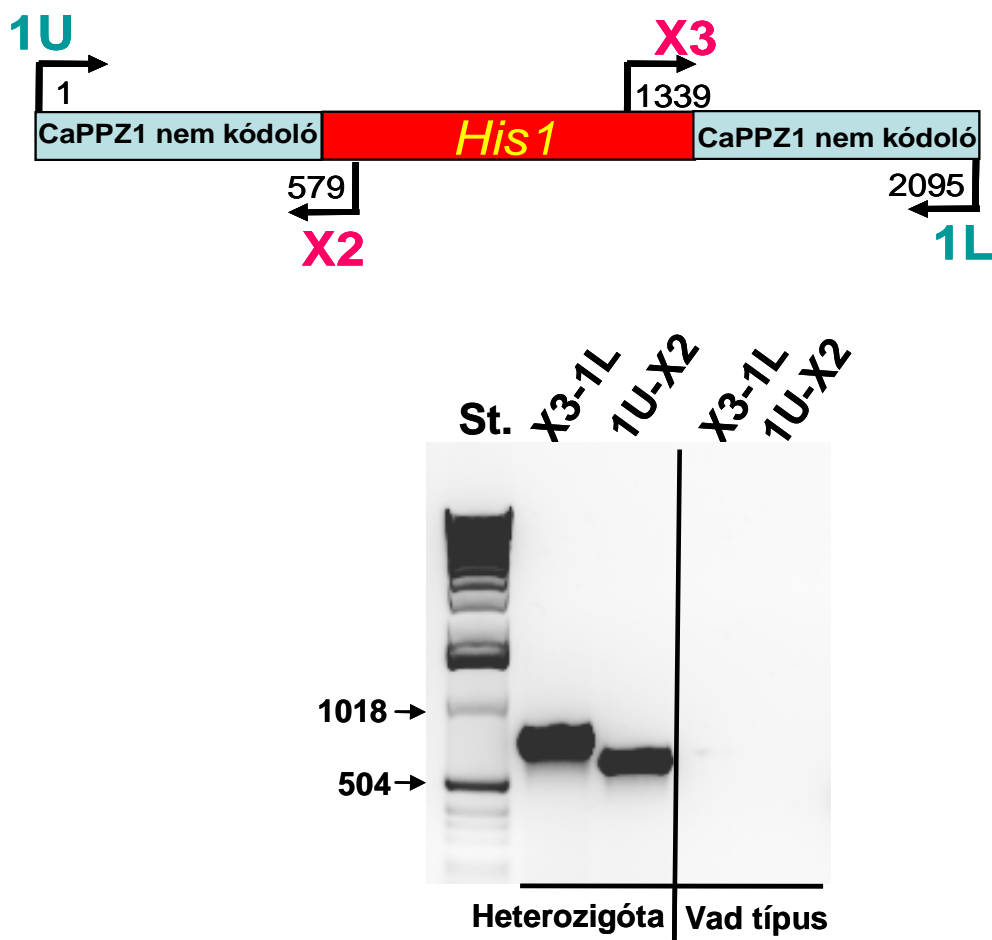
**12.táblázat. Két független méréssorozat átlagának és szórásának százalékos értéke**

	Kontroll		ppz1 KO	
	Átlag (%)	Szórás (%)	Átlag (%)	Szórás (%)
0,0	100,0	3,347	100,0	2,118
1,0	108,2	2,088	94,0	3,014
2,5	95,8	1,180	39,7	1,172
5,0	38,9	2,200	3,5	0,378
7,5	10,4	0,893	1,4	0,232
15,0	3,9	0,252	0,5	0,225

## 4. Eredmények

### 4.1. Az első *CaPPZ1* allél megszakítás ellenőrzése

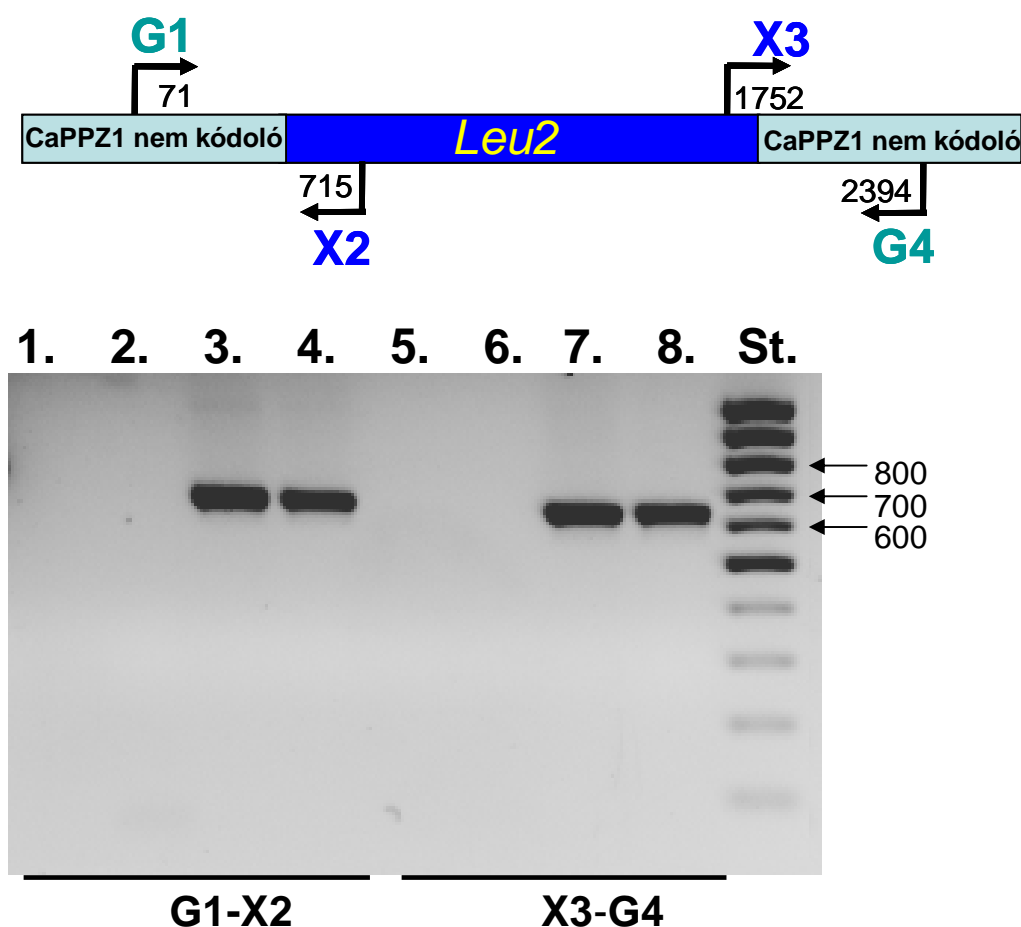
A *His1* génnel megszakított sejteket hisztidin mentes táptalajon szelektáltuk és a kinőtt telepekből genomi DNS-t izoláltunk. A gén megszakítását PCR reakciókkal ellenőriztük. A kísérletek során 1U-X2 és X3-1L primerpárokkal vizsgáltuk a heterozigóta mutáns törzset és a kontroll törzset. Az 1U és az 1L primerpár a *CaPPZ1* gén nem kódoló régiójára specifikus. Az X2-His és az X3-His a *His1* gén kódoló régiójára specifikus primerek. Így csak akkor keletkezhet PCR termék, ha a *CaPPZ1* kódoló régió helyre beépült a *His1* gén (5. ábra). A PCR termékek agaróz gélelektroforézise során a várt sávokat kaptuk, amely a *His1* gén integrációját bizonyította. A kontroll törzs nem adott PCR reakciót (5. ábra).



5. ábra. A *His1* génnel megszakított allél és a primerek kapcsolódási helyei és a PCR termékek ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel. St az 1 kb-os standard-et jelöli. A sávok méretét bázispárban (bp) adtuk meg.

#### 4.2. A második *CaPPZ1* allél megszakítás ellenőrzése

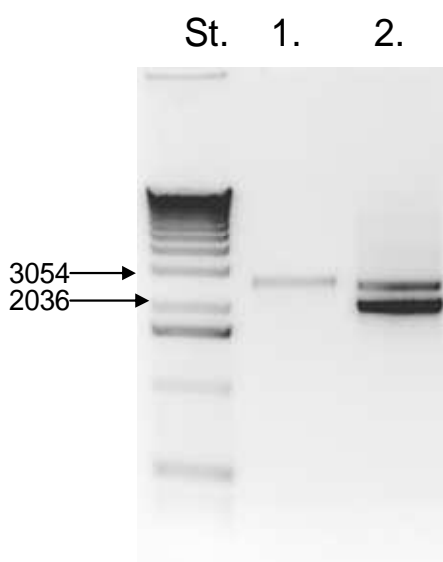
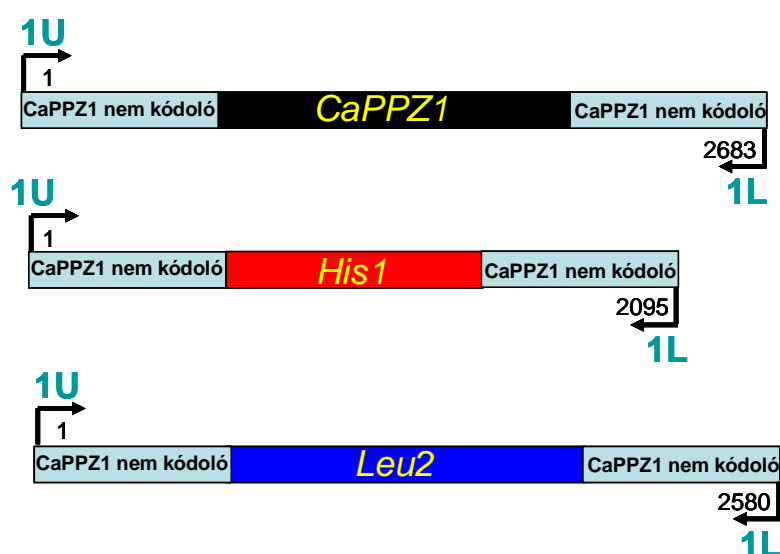
A *Leu2* génnel megszakított sejteket hisztidin és leucin mentes minimál táptalajon szelektáltuk és a kinőtt telepekből genomi DNS-t preparáltunk. Az integrációt PCR reakciókkal ellenőriztük. A reakciók során G1-X2 és X3-G4 primerpárokat használtunk fel. A G1 és a G4 a *CaPPZ1* nem kódoló régióra specifikus primerek. Az X2-*Leu2* és az X3-*Leu2* primerek a *Leu2* gént kódoló régióra specifikusak (6. ábra). A kontroll törzs és a heterozigóta mutáns esetében nem keletkezett PCR termék. A homozigóta mutáns (*His1* génnel megszakított első allél és *Leu2* génnel megszakított második allél) esetében a megfelelő méretű PCR terméket kaptam ami a *Leu2* gén integrációját bizonyítja (6. ábra).



6. ábra. A *Leu2* génnel megszakított allél és a primerek kapcsolódási helyei és a PCR termékek ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel. Az 1. és 5. sávba a kontroll törzs, 2. és 6. sávba a heterozigóta mutáns, 3., 4., 7. és 8. sávba pedig a homozigóta mutáns PCR termékeit vittük fel. St. az 100 bp-os standard-et jelöli. A sávok méretét bázispárban (bp) adtuk meg.

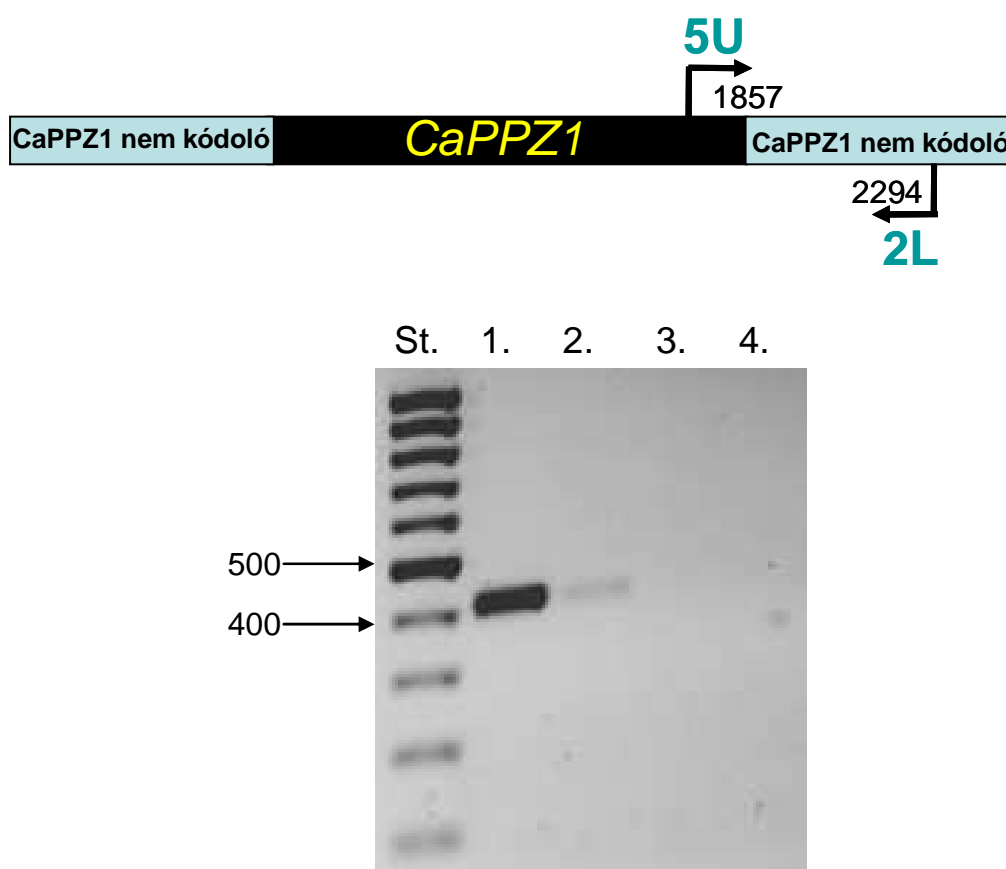
### 4.3. A vad típusú *CaPPZ1* allél eliminációjának ellenőrzése

Az 1U-1L primerpár, a *CaPPZ1* nem kódoló régió végeire specifikus (7. ábra). Ezzel a primerpárral végzett reakció során a kontroll törzs, a heterozigóta mutáns és a homozigóta mutáns esetében is keletkezik termék, csak különböző méretben. A *CaPPZ1* gént tartalmazó allél esetében keletkező termék 2683bp hosszú. A megszakított allélokról rövidebb termék keletkezik. A *His1* gént tartalmazó allérről 2095bp hosszú, a *Leu2* gént tartalmazó allérről pedig 2580bp hosszú termék keletkezik. A PCR termékek agaróz gélelektroforetikus vizsgálata során a várt hosszúságú sávokat kaptuk (7. ábra).



7. ábra. Az ábrán láthatók a *CaPPZ1*, *His1*, és *Leu2* gént tartalmazó allélok az 1U-1L primerpár kapcsolódási helyei és a PCR termékek ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel. 1. sávba kontroll törzs, a 2. sávba a homozigóta mutáns PCR termékeit vittük fel. St. az 1 kb-os standard-et jelöli. A sávok méretét bázispárban (bp) adtuk meg.

Mivel a 2683bp (7.ábra 1. sáv) illetve a 2580bp (7. ábra 2. sáv) méretű PCR termékek egymáshoz hasonlóan futnak az 5U-2L primerpárral vizsgáltuk a vad allél jelenlétét. Az 5U primer a *CaPPZ1* gént kódoló régióra, a 2L primer pedig a nem kódoló régióra specifikus (8. ábra). A *CaPPZ1* gént tartalmazó allél jelenlétét vizsgáltuk. A kontroll törzs mindkét alléljáról és a heterozigóta mutáns egyik alléljáról keletkezett PCR termék amelyek, agaróz gélelektroforézise során kimutathatóak voltak. A homozigóta mutánsról a várakozásainknak megfelelően nem keletkezett termék (8. ábra). Tehát a gén megszakítása sikeres volt, a *CaPPZ1* gén mindkét allélja elvesztette kódoló régióját.



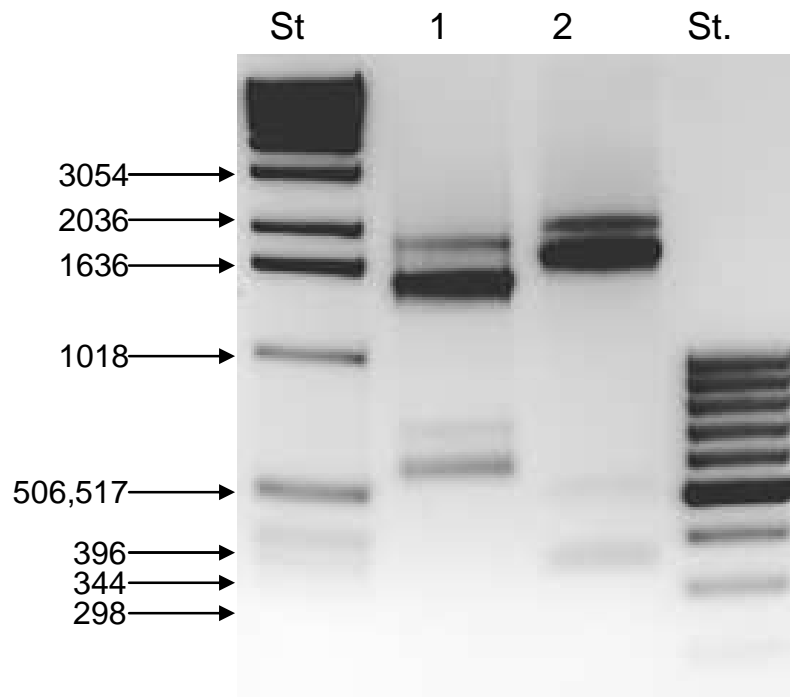
8. ábra. A *CaPPZ1* gént tartalmazó allélon az 5U-2L primerpár kapcsolódási helye és a PCR termékek ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel. 1. sávba kontroll törzs, 2. sávba a heterozigóta mutáns 3. és 4. sávban pedig a homozigóta mutáns PCR termékeit vittük fel.

St. az 100 bp-os standard-et jelöli. A sávok méretét bázispárban (bp) adtuk meg.

#### 4.4. PCR termékek ellenőrzése restrikciós emésztéssel

A PCR termékek a vártnak megfelelő méretűek voltak, de helyességüket a biztonság kedvéért restrikciós emésztéssel is ellenőriztük. A homozigóta mutáns 1U-1L primerpárral készített termékével dolgoztunk (7. ábra). A PCR terméket *EcoRI* és *BamHI* restrikciós

enzimekkel vizsgáltuk. A restriktációs térkép szerint az *EcoRI* a *His1* gént tartalmazó terméket 1511bp és 584bp, a *Leu2* gént tartalmazó terméket pedig 1870bp és 710bp hosszúságú fragmentre hasítja. A *BamHI* enzim a *His1* gént tartalmazó terméket 1749bp és 346bp, a *Leu2* gént tartalmazó terméket pedig 2070bp és 510bp hosszúságú fragmentre hasítja. A restriktációs emésztést agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük és a várt sávokat kaptuk (9. ábra). Tehát a PCR a megfelelő termékeket amplifikálta.



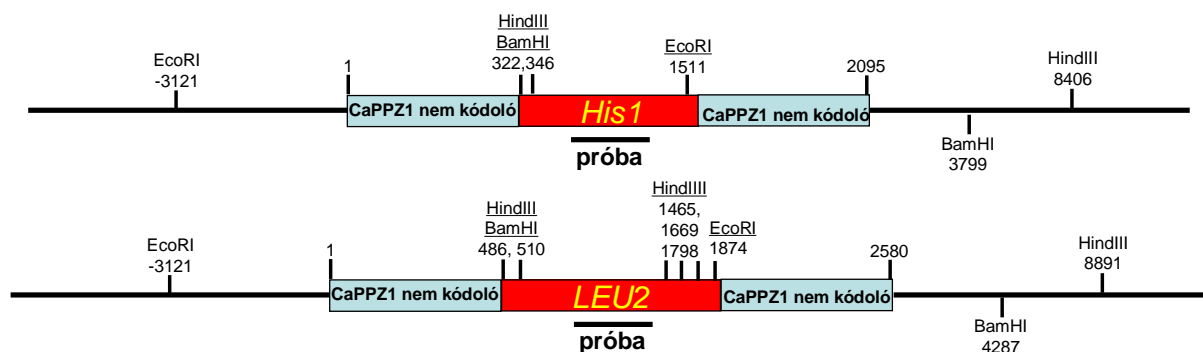
9. ábra. A restriktációs emésztés ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel. 1: *EcoRI* enzimmel vizsgált PCR termék 2: *BamHI* enzimmel vizsgált PCR termék. St. az 1kb-os standard-et jelöli. A sávok méretét bázispárban (bp) adtuk meg.

#### 4.5. A génmegszakításhoz használt kazetták ektópikus beépülésének kizárása Southern blottal

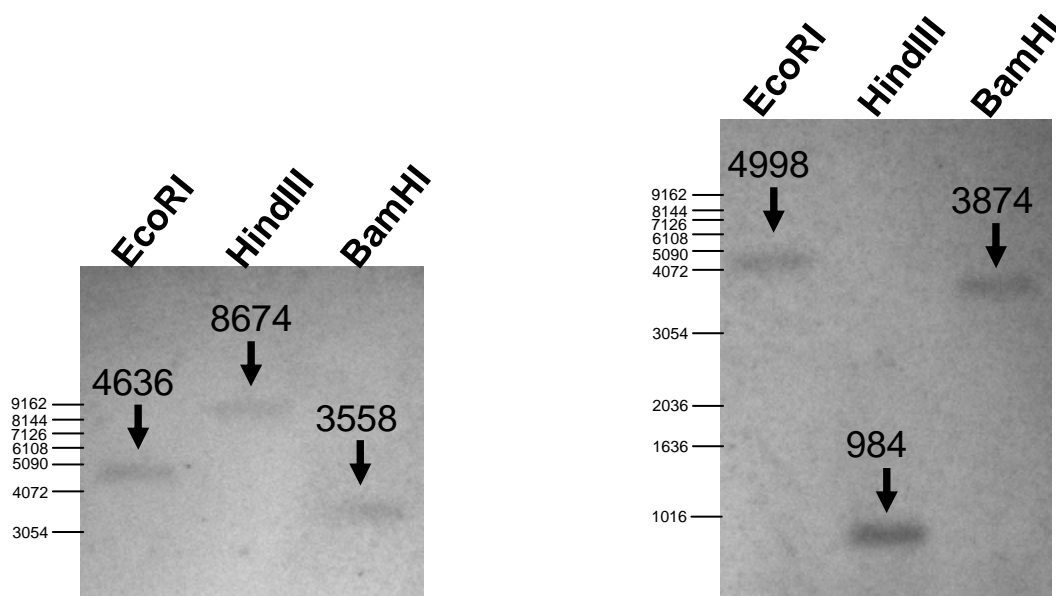
A Southern blot során a *CaPPZI* homozigóta mutáns három párhuzamos DNS mintáját emésztettük három különböző enzimmal. A mintákat *EcoRI*, *HindIII* és *BamHI* enzimekkel vágtuk, amelyekről elmondható, hogy mindkét megszakított allélt több helyen hasítják (10. ábra). Így különböző hosszúságú termékek keletkeztek a *His1* és a *Leu2* gént tartalmazó allélekből (10. ábra). A *His1* és *Leu2* génekre specifikus próbákkal hibridizálva az emésztett DNS mintákat 1-1 terméket vártunk. A *His1* próbával 4636bp, 8674bp és 3558bp, a *Leu2* próbával 4998bp, 984bp és 3847bp méretű hibridizált sávok keletkeztek, amik megfeleltek a várakozásnak (11. ábra). Ezen kívül más sávokat nem kaptunk, tehát kizárhatjuk a *His1* és *Leu2*



tartalmú kazetták ektópikus integrációját. Így kísérlettel igazoltuk, hogy *His1* és *Leu2* génnel sikerült megszakítani a *CaPPZ1* gént és máshova nem épültek be a kazetták.



10. ábra. *His1* és a *Leu2* géneket tartalmazó megszakított *CaPPZ1* gén térképe, és a hibridizációhoz használt próbák kötődési területe



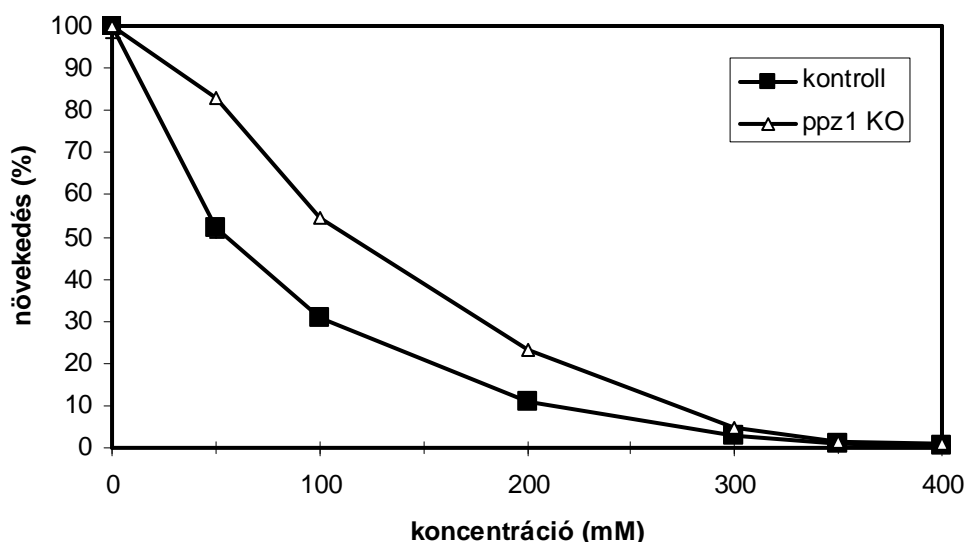
11. ábra. Bal oldalon az 1.allél megszakítás eredményét ellenőriztük *His1* specifikus próbával, jobb oldalon a 2.allél megszakításának ellenőrzése látható *Leu2* specifikus próbával. St. az 1kb-os standard-et jelöli. A sávok számított méretét bázispárban (bp) adtuk meg.

#### 4.6. Stressz hatások vizsgálata

Miután sokoldalúan bizonyítottuk a gén megszakítás sikerességét a rendelkezésünkre álló homozigóta KO mutánsal megvizsgálhattuk a *CaPPZ1* gén funkcióit.

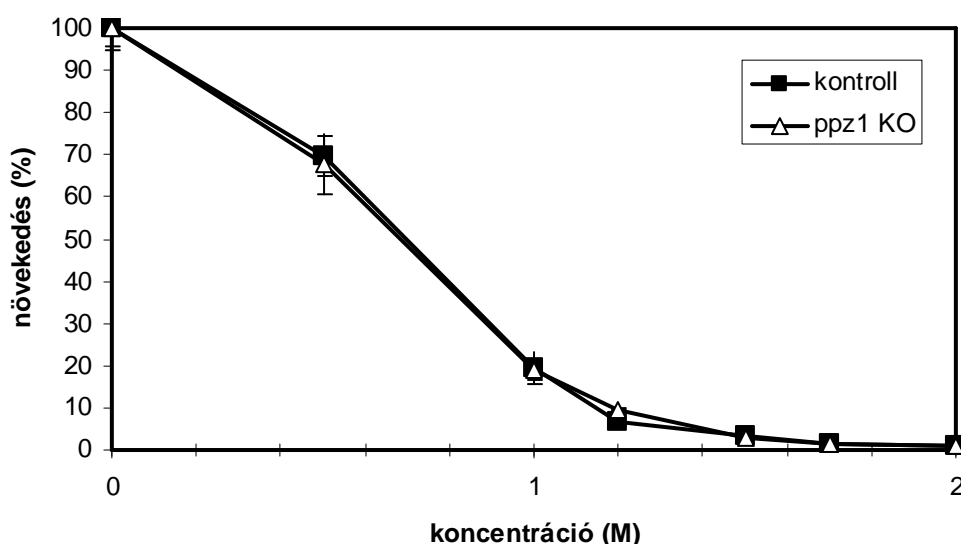
#### 4.6.1. A homozigóta mutáns só tűrésének vizsgálata

LiCl-dal és NaCl-dal vizsgáltuk a *CaPPZI* szerepét az ozmotikus stabilitásban. A gomba növekedését különböző sókoncentrációk mellett vizsgáltuk a 3.5.10. fejezetben leírtak szerint. A homozigóta mutáns LiCl-dal szemben toleránsnak bizonyult a kontroll sejtekhez képest (12. ábra).



12. ábra. Homozigóta mutáns (ppz1-KO) és kontroll sejtek növekedésének görbéje növekvő LiCl koncentráció jelenlétében. LiCl koncentrációja: 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM volt. Az eredmények 6 mérés átlagát és hibáját mutatják.

NaCl jelenlétében nem találtunk lényeges különbséget (13. ábra).

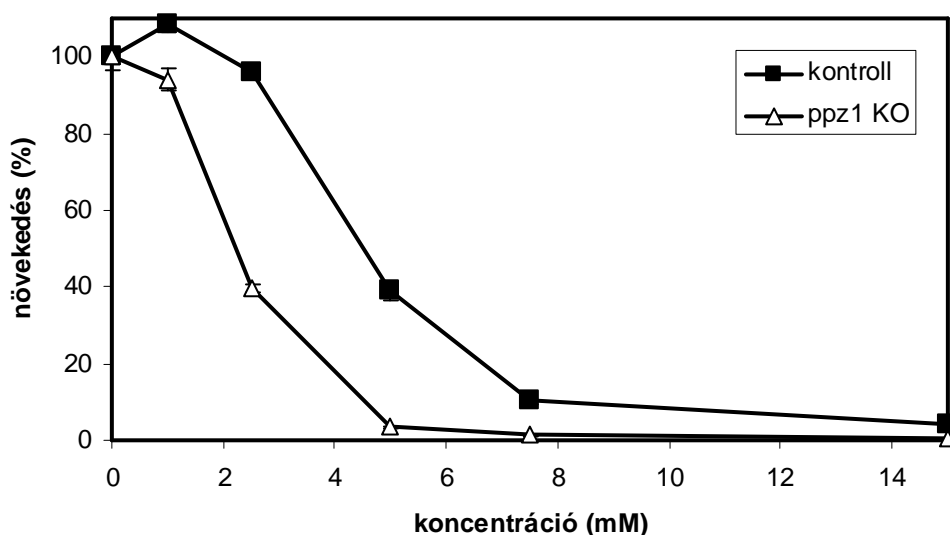


13. ábra Ppz1-KO és kontroll sejtek növekedésének görbéje növekvő NaCl koncentráció jelenlétében. A NaCl koncentrációja: 0,5 M, 1 M, 1,2 M, 1,5 M, 1,7 M, 2 M volt. Az eredmények 6 mérés átlagát és hibáját mutatják.

*S. cerevisiae*-ben a PPZ hiányos sejtekben növekszik az ENA1 gén expressziója, ami  $\text{Na}^+$  kiáramláshoz és  $\text{Na}^+$  toleranciához vezet és valószínűleg ezzel magyarázható a vizsgált sejtek  $\text{Li}^+$  toleranciája (Posas és mtsai, 1995). A LiCl-dal kapott eredményünk azt bizonyítja, hogy a CaPPZ1 szerepet játszik a *C. albicans* sejtek ozmotikus stabilitásában. A NaCl hatás hiányát a magas sókoncentráció okozta növekedés gátlással, vagy az ENA1 expresszió növekedésének hiányával magyarázhatjuk. Az utóbbi lehetőség kivizsgálására további kísérletet tervezünk.

#### 4.6.2. A homozigóta mutáns koffein érzékenységének vizsgálata

A CaPPZ1 sejtfa szintézisére kifejtett hatásait vizsgáltuk koffeinnel. Különböző koncentrációjú koffein jelenlétében vizsgáltuk a homozigóta mutáns és a kontroll sejtek növekedését (14. ábra).

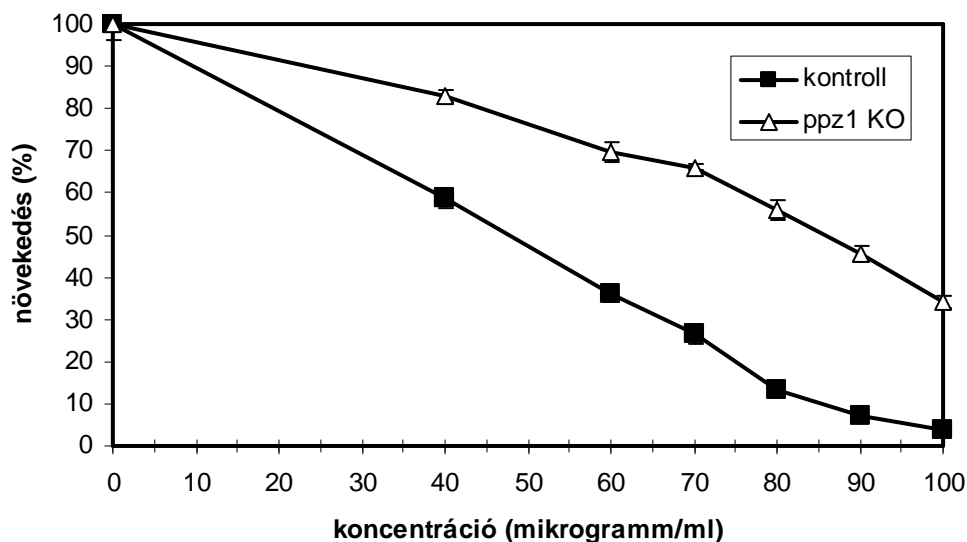


14. ábra. Homozigóta mutáns (ppz1-KO) és kontroll sejtek növekedésének görbéje növekvő koffein koncentráció jelenlétében. A sejteket 1 mM, 2,5 mM 5 mM 7,5 mM 15 mM koncentrációjú koffein jelenlétében vizsgáltuk. A diagram 6 mérés átlagát és hibáját mutatja.

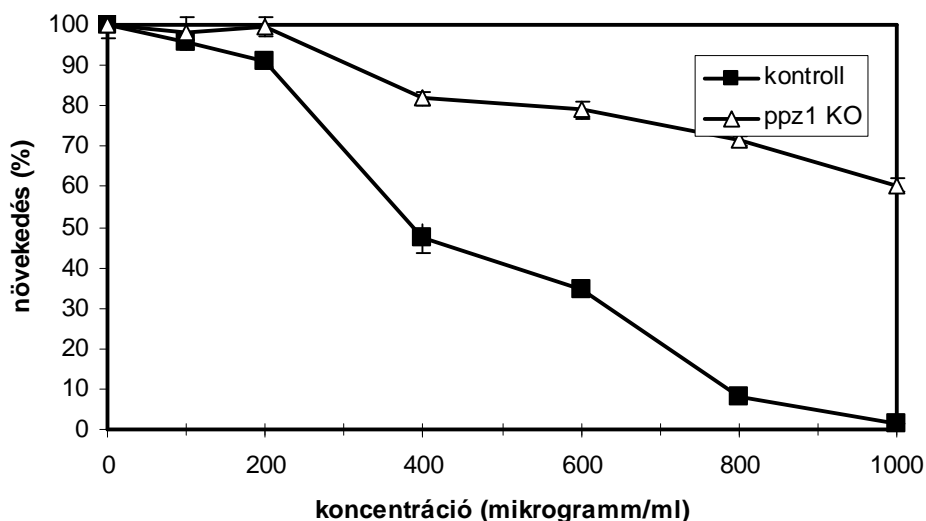
A homozigóta mutáns törzs koffeinnel szemben érzékenyebb volt a kontrollhoz képest. Valószínűleg azzal magyarázható, hogy a PPZ hiányos sejtekben PKC jelátviteli útvonal módosul, ami a sejtfa szintézis gátlásához vezet (Lee és mtsai, 1993).

#### 4.6.3. A homozigóta mutáns Hygromycin B és spermin tűrésének vizsgálata

A töltéssel rendelkező molekulák segítségével a *CaPPZ1* sejtmembrán integritásában játszott szerepét teszteltem. Hygromycin B-vel és sperminnel szemben a homozigóta mutáns törzs toleránsabb volt a kontrollhoz képes (15. és 16. ábra).



15. ábra. Homozigóta mutáns (ppz1-KO) és kontroll sejtek növekedésének görbéje növekvő Hygromycin B koncentráció jelenlétében. A sejteket 40 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml 80 µg/ml 90 µg/ml, 100 µg/ml koncentrációjú stressz hatású anyag jelenlétében vizsgáltuk. A diagram 6 mérés átlagát és hibáját mutatja.



16. ábra. Homozigóta mutáns (ppz1-ko) és kontroll sejtek növekedésének görbéje növekvő spermin koncentráció jelenlétében. A sejteket 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml 600 µg/ml 800 µg/ml, 1000 µg/ml koncentrációjú stressz hatású anyag jelenlétében vizsgáltuk.

A diagram 6 mérés átlagát és hibáját mutatja.

Tehát a gén kiütése csökkentette a pozitív kationok iránti érzékenységet. A sejtek toleranciája azzal magyarázható, hogy a csökkent membrán potenciál miatt csökkent a pozitív kationok felvétele (Yenush és mtsai, 2002).

#### 4.7. Konklúzió

A *CaPPZ1* gén funkciójának vizsgálatakor különböző anyagok jelenlétében néztük a homozigóta mutáns és kontroll sejtek növekedését. Korábban már végeztek PPZ deléciós mutánsokkal vizsgálatokat *S. cerevisiae* (Yenush és mtsai, 2002 Posas, 1995) és *S. pombe* (Balcells, 1997) modell organizmusokban. Eredményeinket a 12. táblázatban hasonlítjuk össze az irodalmi adatokkal. A LiCl, koffein, Hygromycin B és spermin vizsgálatok a másik két gombával egybevágó eredményeket kaptunk. A sejtek NaCl-dal való vizsgálatakor nem találtunk jelentős különbséget a kontroll törzs és a homozigóta mutáns között annak ellenére, hogy *S. cerevisiae* és *S. pombe* esetében toleranciát mutattak a PPZ hiányos sejtek. Az eltérés oka lehet a *C. albicans* nagyobb érzékenysége a NaCl magas koncentrációra, vagy a *CaPPZ1* gén korábbiaktól eltérő funkciója ebben a gombában.

12. táblázat Különböző gombafajokban a *CaPPZ1* gén kiütésének hatása

Stressz hatás	<i>C.albicans</i> $\Delta Cappz1$	<i>S. cerevisiae</i> $\Delta ppz1$	<i>S. pombe</i> $\Delta pzh1$
LiCl	+	+	+
NaCl	=	+	+
Koffein	-	-	-
Hygromycin B	+	+	+
Hygromycin B	+	+	+

+ tolerancia; = nincs hatás; - érzékenység

## 5. Összefoglalás

Eukariótákban jelentős szabályozó szerepet tölt be a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja. A Ser és Thr oldalláncok defoszforilációját katalizáló protein foszfatáz Z csak gombákban fordul elő. *S. cerevisiae* és *S. pombe* élesztőkön végzett kísérletek alapján szerepe lehet az ozmotikus stabilitásban, a sejt méretének és integritásának fenntartásában. A *C. albicans*ban egy protein foszfatáz Z1 (*CaPPZ1*) gén található, melynek funkciója még nem ismert. Ezt a kérdést a gén megszakításával kívántuk tanulmányozni.

Tekintettel arra, hogy ez a diploid gomba aszexuális módon szaporodik, a gén két alléljének megszakítása két homológ rekombináción alapuló lépésben történt. Kísérletünkhöz hisztidin és leucin auxotrófiát mutató *C. albicans* törzset használtunk fel. Az egyik allél megszakításához *His1* gént tartalmazó kazettával transzformáltuk az auxotróf törzset, majd a hisztidinre történő szelekció során kapott törzset használtuk a másik allél megszakításához. Ez utóbbit *Leu2* gént tartalmazó kazettával transzformáltuk, és minimál táptalajon szelektáltuk a megfelelő transzformánsokat.

Munkám során heterozigóta és homozigóta *CaPPZ1* deléciós mutánsokkal illetve a kontroll törzssel dolgoztam, és elvégeztem a gén megszakításának ellenőrzését valamint a *CaPPZ1* funkciójának vizsgálatát. A gén megszakítását PCR reakciók segítségével ellenőriztem. A reakciók során alkalmazott primerpárok egyik tagja a *His1* vagy *Leu2* génre, a másik tagja pedig a *CaPPZ1* nem kódoló régiójára volt specifikus. Mindkét esetben a várt méretű termékeket kaptam, melyek igazolták a *CaPPZ1* gén sikeres megszakítását. A génmegszakító kazetták nem megfelelő helyre történő integrációját Southern blot kísérlettel zártuk ki.

Megvizsgáltam a homozigóta *PPZ1* KO *C. albicans* törzs stressz hatásokkal szembeni viselkedését. NaCl jelenlétében nem találtam jelentős különbséget a kontroll illetve a *PPZ1* KO törzs növekedése között. A mutáns törzs LiCl-al szemben toleránsnak bizonyult a kontroll sejtekhez képest. A homozigóta mutáns sejtek koffeinnel szemben érzékenyebb, míg Hygromycin B és spermin jelenlétében toleránsabb volt a kontrollhoz képest. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a *CaPPZ1* szerepet játszik a gomba ozmotikus stabilitásában és a sejtfal szintézisében.

## 6. Felhasznált irodalom

- Balcells L, Gómez N, Casamayor A, Clotet J, Ariño J., 1995. Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase *Eur J Biochem.* 250:476-83.
- Barford D, Jia Z, Tonks NK., 1995. Protein tyrosine phosphatases take off. *Nat Struct Biol.* 2: 1043-1053.
- Clotet J, Garí E, Aldea M, Ariño J., 1999. The yeast ser/thr phosphatases *sit4* and *ppz1* play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 19: 2408-2415.
- De Nadal E, Clotet J, Posas F, Serrano R, Gomez N, Ariño J., 1998. The yeast halotolerance determinant *Hal3p* is an inhibitory subunit of the *Ppz1p* Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 7357-7362.
- De Nadal E, Fadden RP, Ruiz A, Haystead T, Ariño J., 2001. A Role for the *Ppz* Ser/Thr Protein Phosphatases in the Regulation of Translation Elongation Factor 1 $\alpha$ . *J Biol Chem.* 276: 14829-14834.
- Dombrádi V. 1997. Comparative analysis of Ser/Thr protein phosphatases. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol.* 3: 23-48
- Hunter T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 80: 225-236.
- Ingebritsen TS, Cohen P., 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science.* 221: 331-338.
- Kovács L, Farkas I, Majoros L, Miskei M, Pócsi I and Dombrádi V, 2010 The polymorphism of the protein phosphatase *Z1* gene in *Candida Albicans* *J Basic Microbiol.*
- Lee KS, Hines LK, Levin DE. 1993. A pair of functionally redundant yeast genes (*PPZ1* and *PPZ2*) encoding type 1-related protein phosphatases function within the *PKC1*-mediated pathway. *Mol Cell Biol.* 13: 5843-5853.
- Noble SM, Johnson AD. 2005, Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 4: 298-309.
- Posas F, Bollen M, Stalmans W, Ariño J., 1995. Biochemical characterization of recombinant yeast *PPZ1*, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* 368: 39-44.
- Schaub Y, Dünkler A, Walther A, Wendland J. 2006. New pFA-cassettes for PCR-based gene manipulation in *Candida albicans*. *J Basic Microbiol.* 46: 416-429.

Yenush L, Mulet JM, Ariño J, Serrano R., 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. EMBO J. 21: 920-929.

## **7. Rövidítések jegyzéke**

aa-aminosav

bp- bázispár

BSA- szarvasmarha szérum albumin

dNTP - dezoxinukleozid trifoszfát

DSP - kettős specifitású protein foszfatáz

EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav

FCP - RNS polimeráz II C-terminális régiójára specifikus protein foszfatáz

HAD- szerin treonin specifikus protein foszfatáz

kb - kilobázispár

PCR - polimeráz láncreakció

PKC - protein kináz C

PPP - foszfoprotein foszfatáz

PPM - fémoon-függő protein foszfatáz

PPZ - protein foszfatáz Z

PTP - protein tirozin foszfatáz

OD - optikai denzitás

SDS - nátrium-dodecil-szulfát

St - standard

Tris - Tris-(hidroximetil)-amino-metán



## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Dombrádi Viktornak egyetemi tanárnak, hogy munkáimat, jegyzőkönyveimet figyelemmel követte és tanácsaival segített, Dr. Gergely Pál egyetemi tanárnak (DE OEC Orvosi Vegytani Intézet) hogy munkámat mindvégig támogatta és lehetővé tette számomra, hogy az Intézetben dolgozzak. Szeretnék köszönetet mondani Ádám Csabának a módszerek elsajátításában nyújtott gyakorlati segítségéért, a kísérletek során felmerülő problémák megoldásáért és Kovács Lászlónak laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért.

Kelemenné Szántó Ágota és Tankáné Farkas Andrea asszisztensek szakmai tapasztalatuk önzetlen átadásával és segítőkész hozzáállásukkal tanítottak labormunkára.

Továbbá köszönöm az Orvosi Vegytani Intézet dolgozóinak, hogy segítettek a laborban való könnyebb eligazodásban és hozzáállásukkal lehetővé tették, hogy közvetlen légkörben jó hangulatban dolgozhattam.

Végül köszönettel tartozunk Dr. Suzanne M. Noble-nak azért hogy rendelkezésünkre bocsátotta *Candida albicans* SN87 törzset.