
Eltérően kifejeződő HMG-KoA reduktáz gének *Mucor circinelloides*-ben

Nagy Gábor, Farkas Anita, Csernetics Árpád, Vágvölgyi Csaba, Papp Tamás

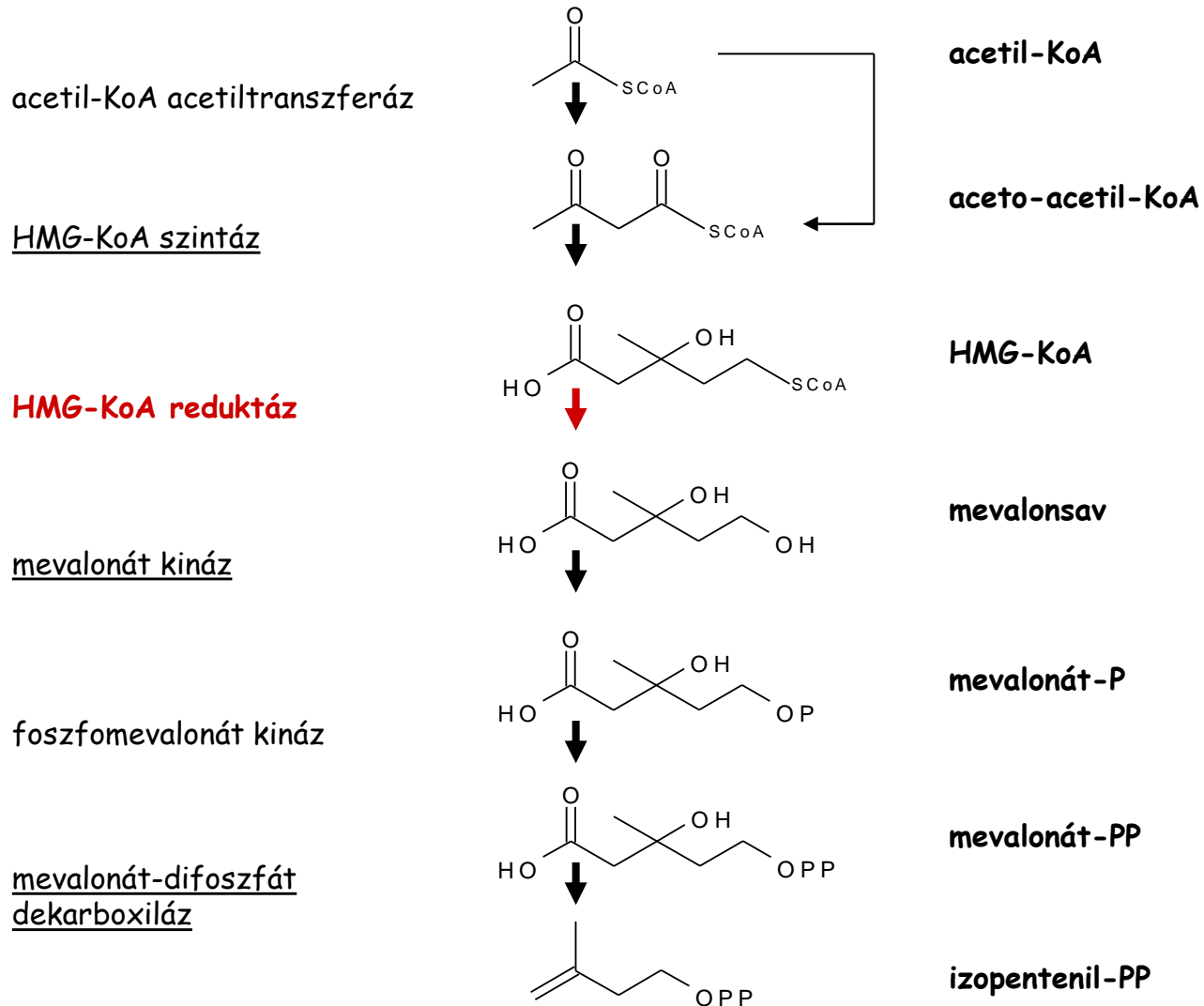
Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék



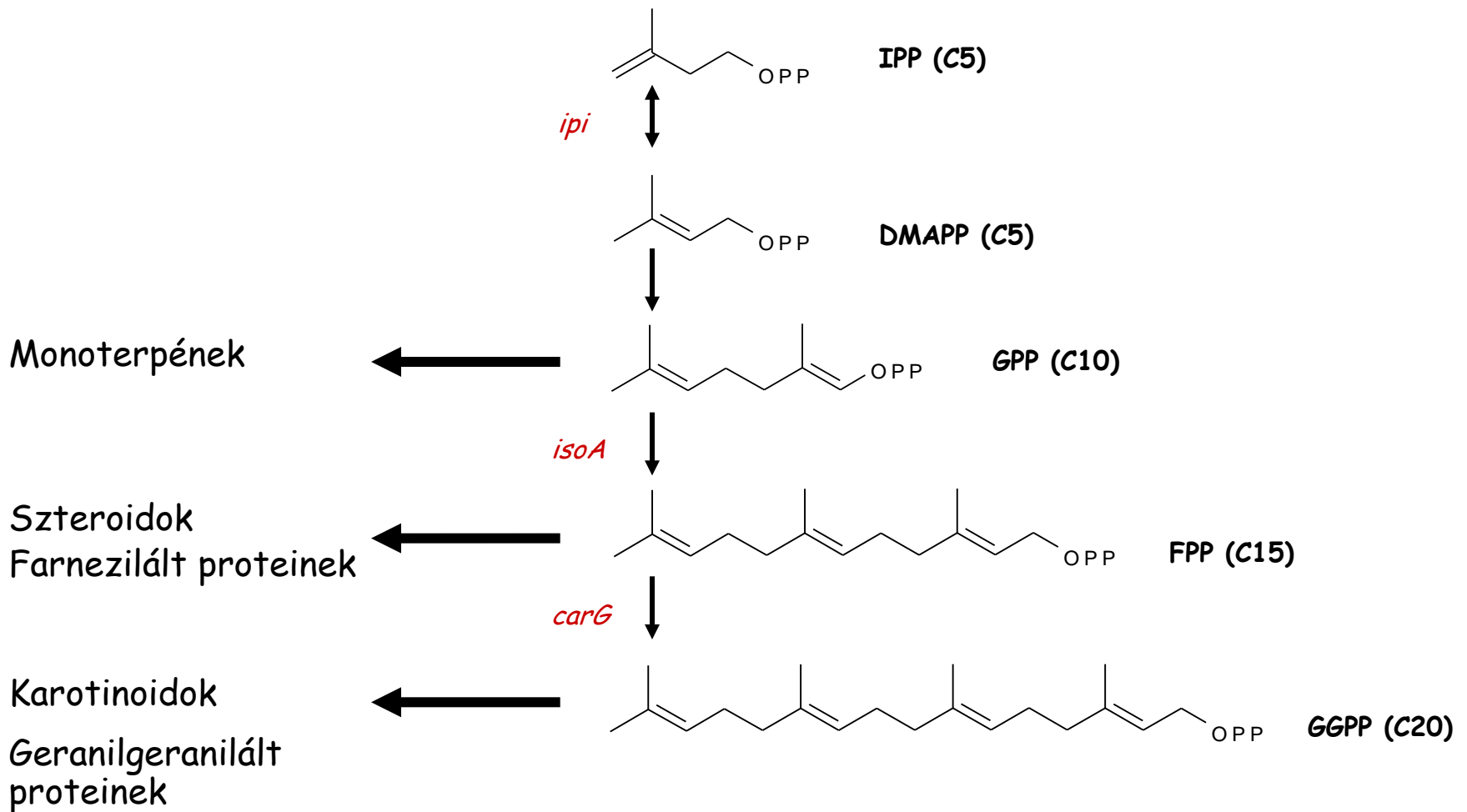
Mucor circinelloides, mint modellorganizmus

- járomspórás gomba
 - <http://genome.jgp-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>
 - genetikai transzformálhatóság
 - mutánsok
-

Mevalonsav útvonal



Izoprén bioszintézis útvonal



3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A reduktáz

- 2-8 transzmembrán domén - N-terminális (SSD)
- endoplazmatikus retikulum
- konzervált C-terminális
- *Homo sapiens* - 1, *Saccharomyces cerevisiae* - 2, *Mucor circinelloides* - 3 (Basson és mtsi. 1986, Lukács és mtsi. 2009)
- Szerepet játszik:
 - Oxigén érzékelés (Thorsness és mtsi. 1989, Casey és mtsi. 1992)
 - Ozmotikus adaptáció (Horvath és mtsi.1998, Vaupotič és mtsi. 2008)

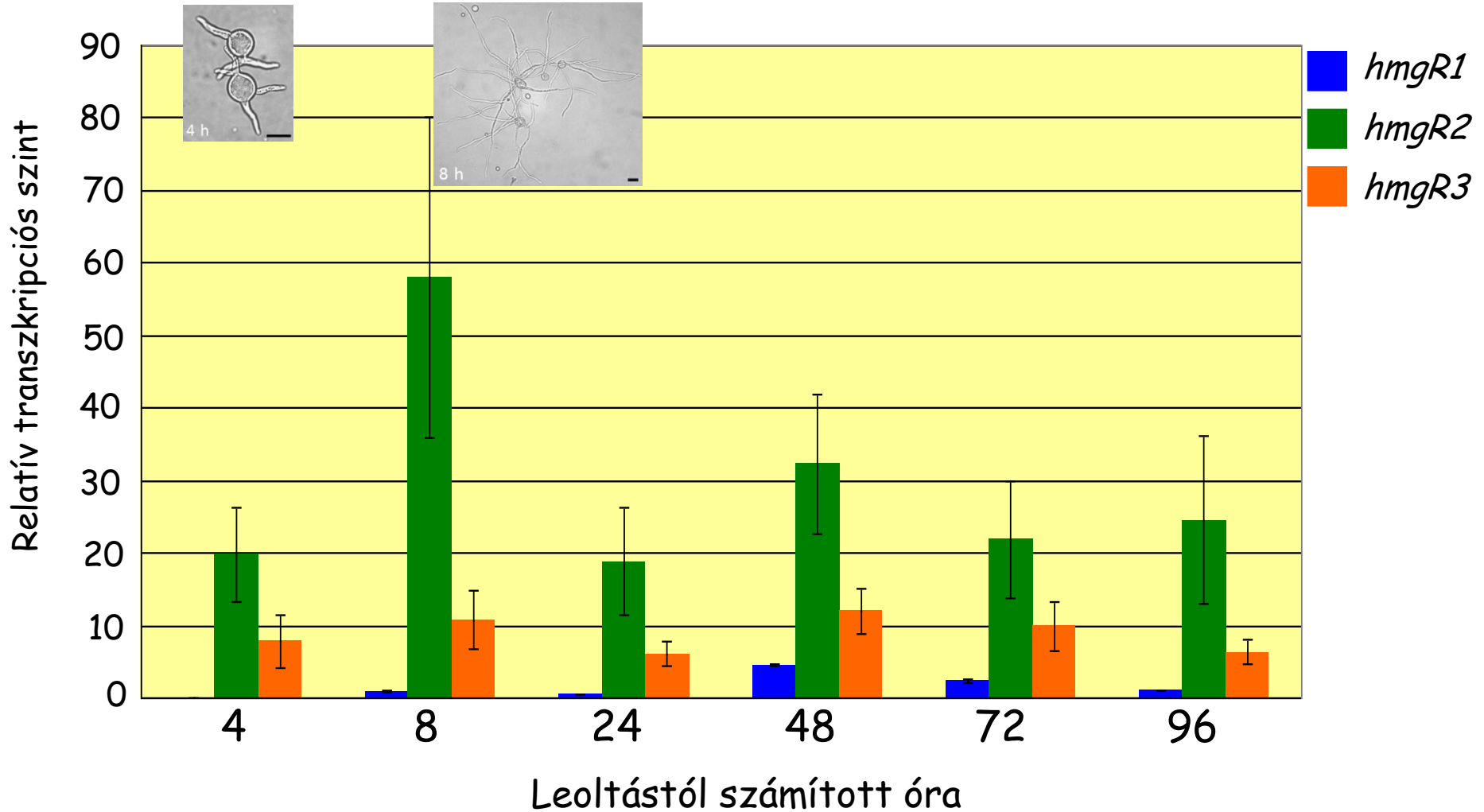
Célkitűzések

- 3 HMG-KoA reduktáz gén (*hmgR1*, *hmgR2*, *hmgR3*)
- eltérő szabályozás
- izoprének keletkezése külön kompartmentekben (Vera Kuzina és mtsi. 2006)
- Célok:
 - relatív transzkripciós szintek meghatározása
 - gének izolálása, klónozása
 - a gének csendesítése, elrontása
 - HPLC-s mérések

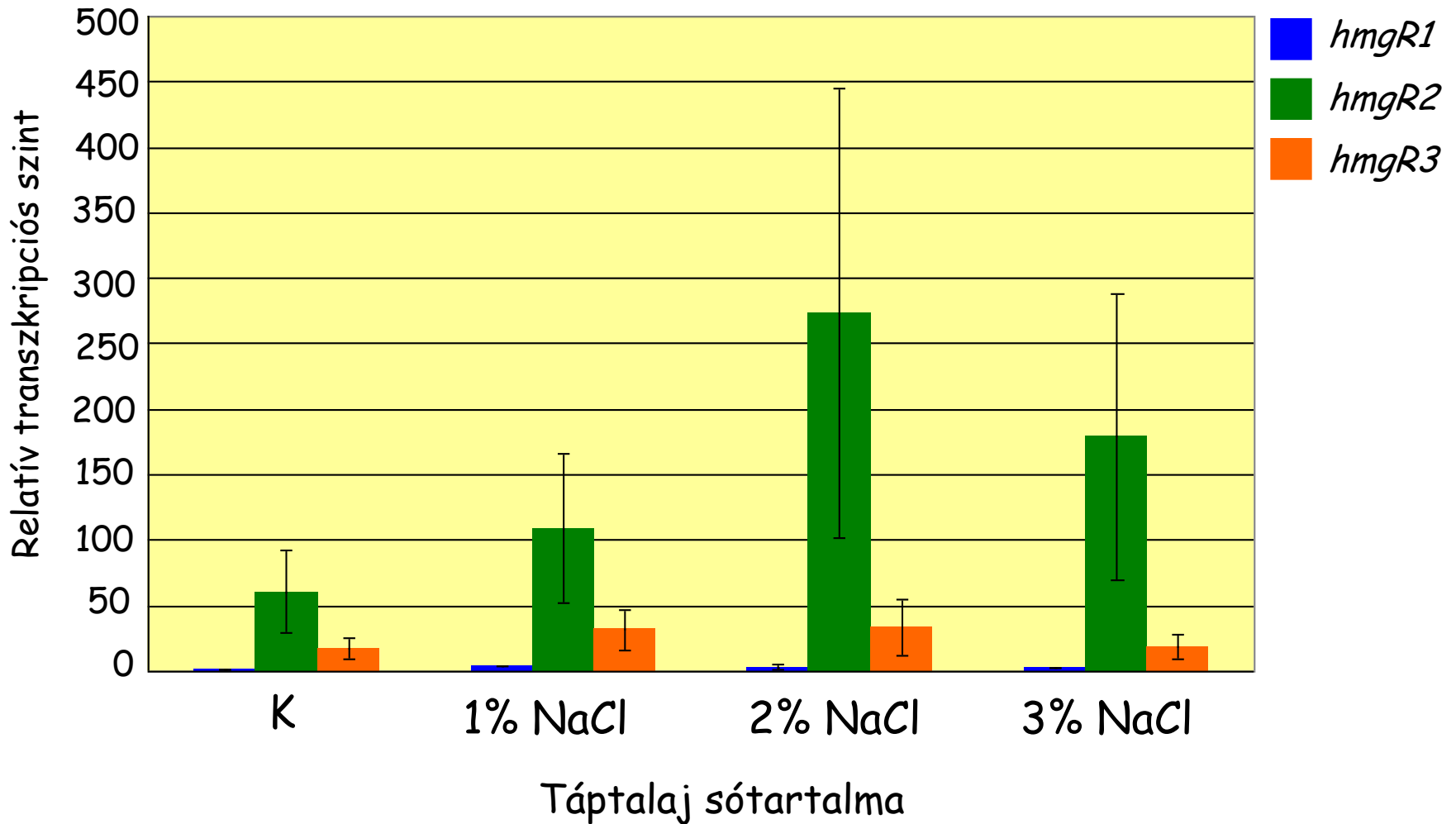
Relatív transzkripciós szintek meghatározása

- RNS→cDNS→real-time PCR
- különböző tenyésztési körülmények
 - idő függvényében
 - só stressz hatása
 - különböző szénforrás
 - aerob/anaerob tenyésztés - dimorf gomba

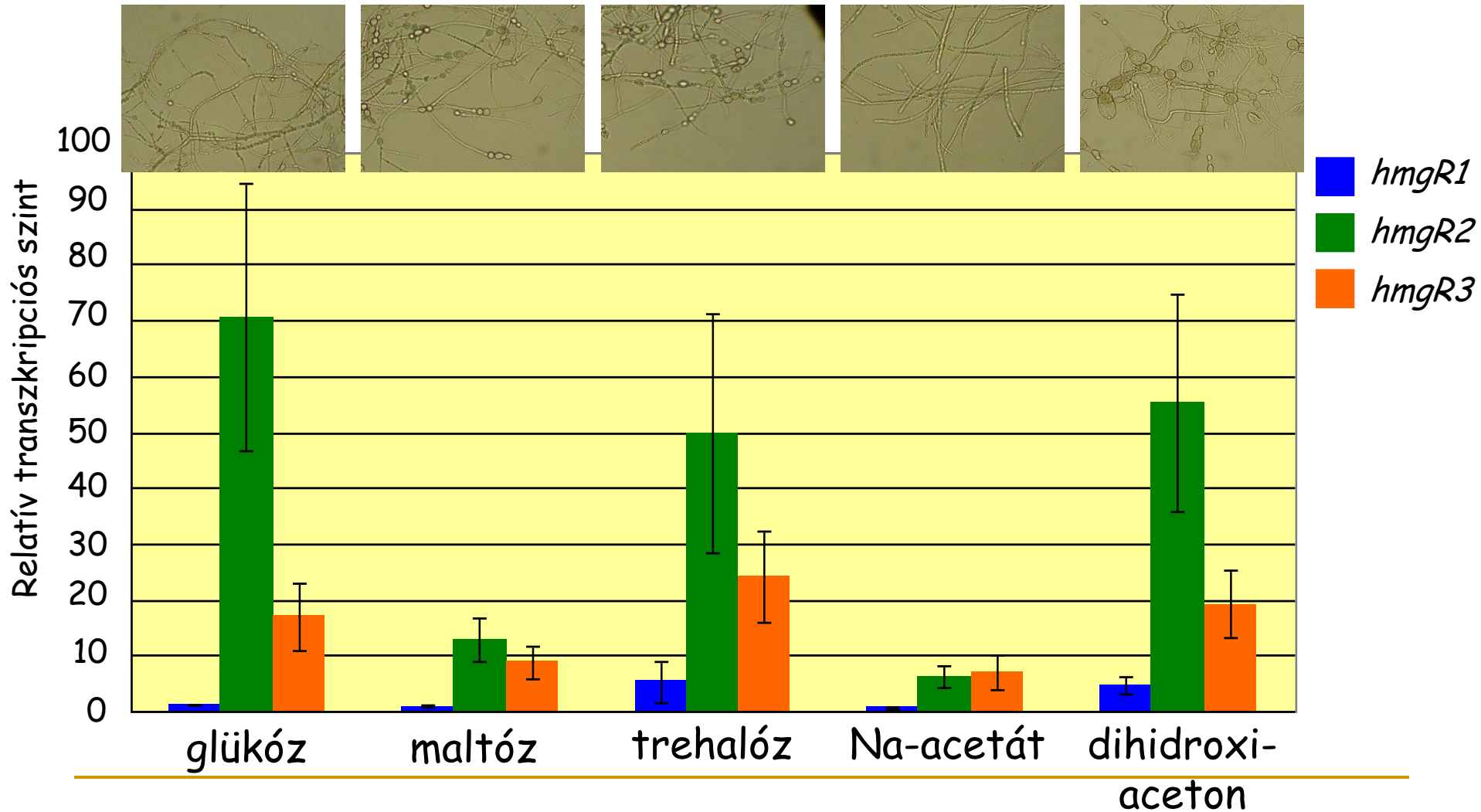
Idő függvényében



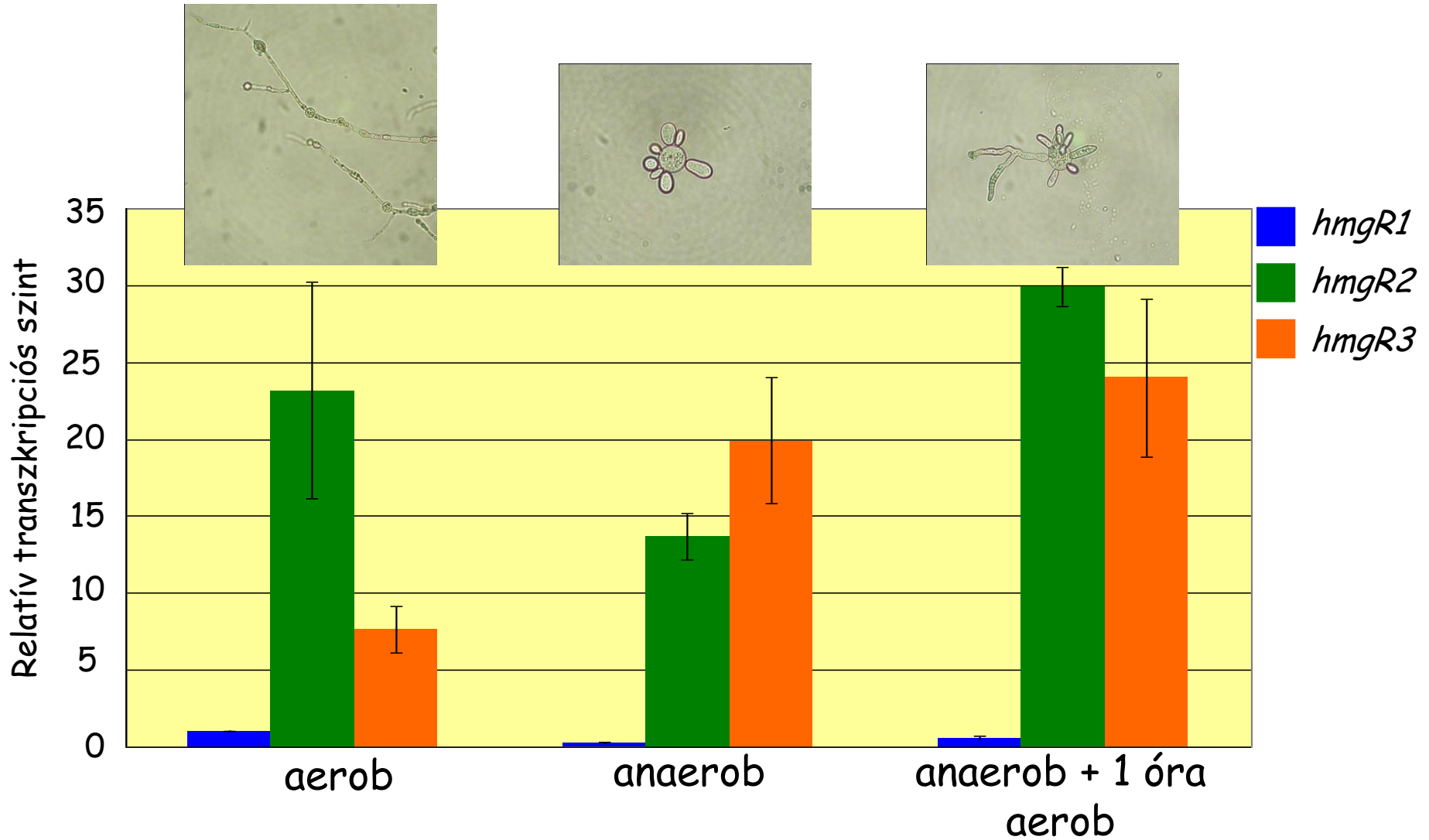
Só stressz hatása



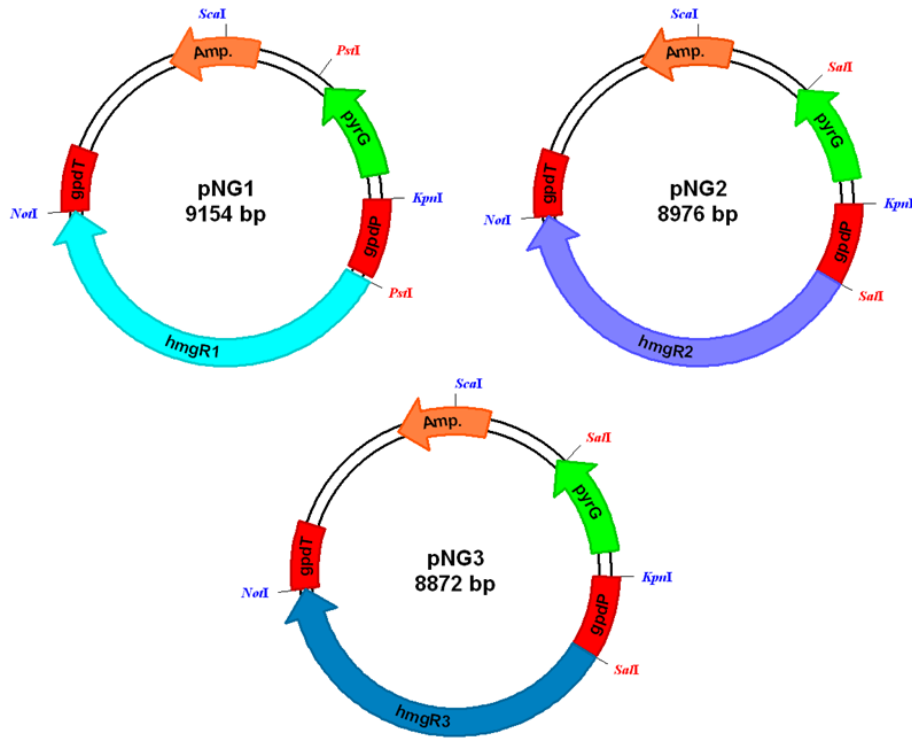
Különböző szénforrások hatása a gének kifejeződésére



Aerob/anaerob tenyésztési körülmény

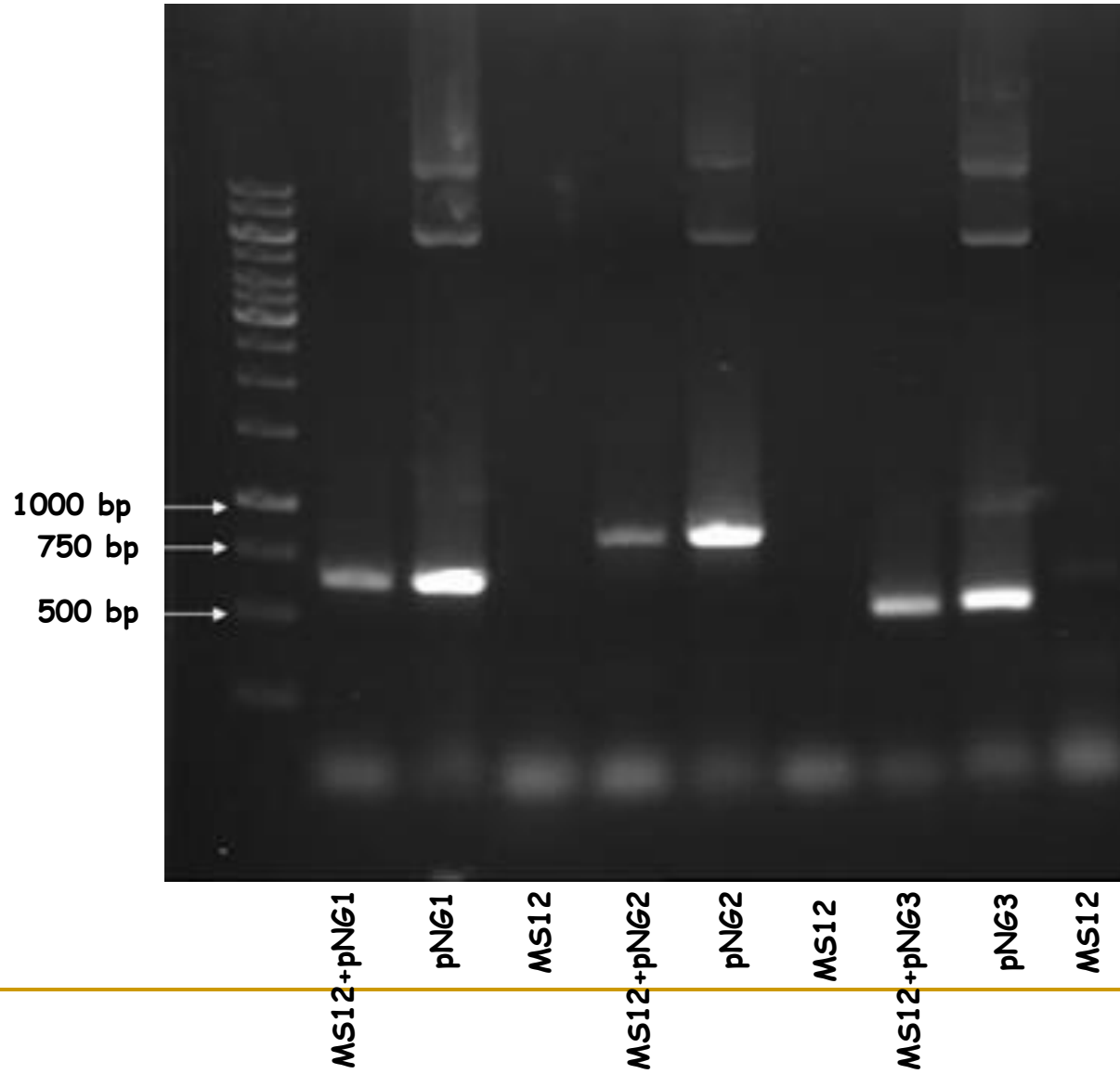


Gének klónozása

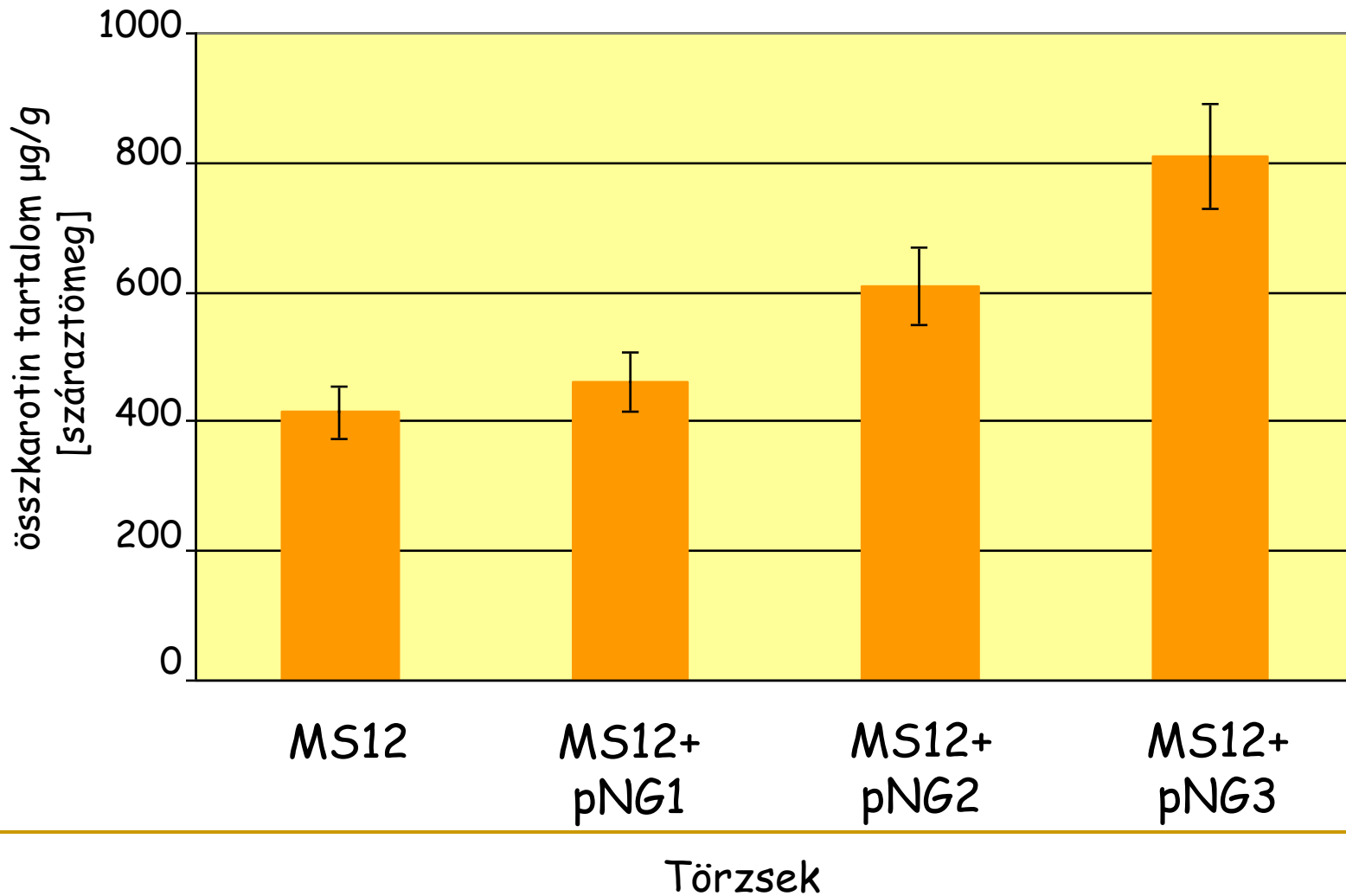


- expressziós vektorok
- PEG-mediált protoplaszt transzformáció
- *M. circinelloides*, MS12 *leu*, *ura* törzs
- transzformánsok izolálása
- autonóm replikatív elem

Plazmidok kimutatása



Transzformánsok összkarotin tartalma

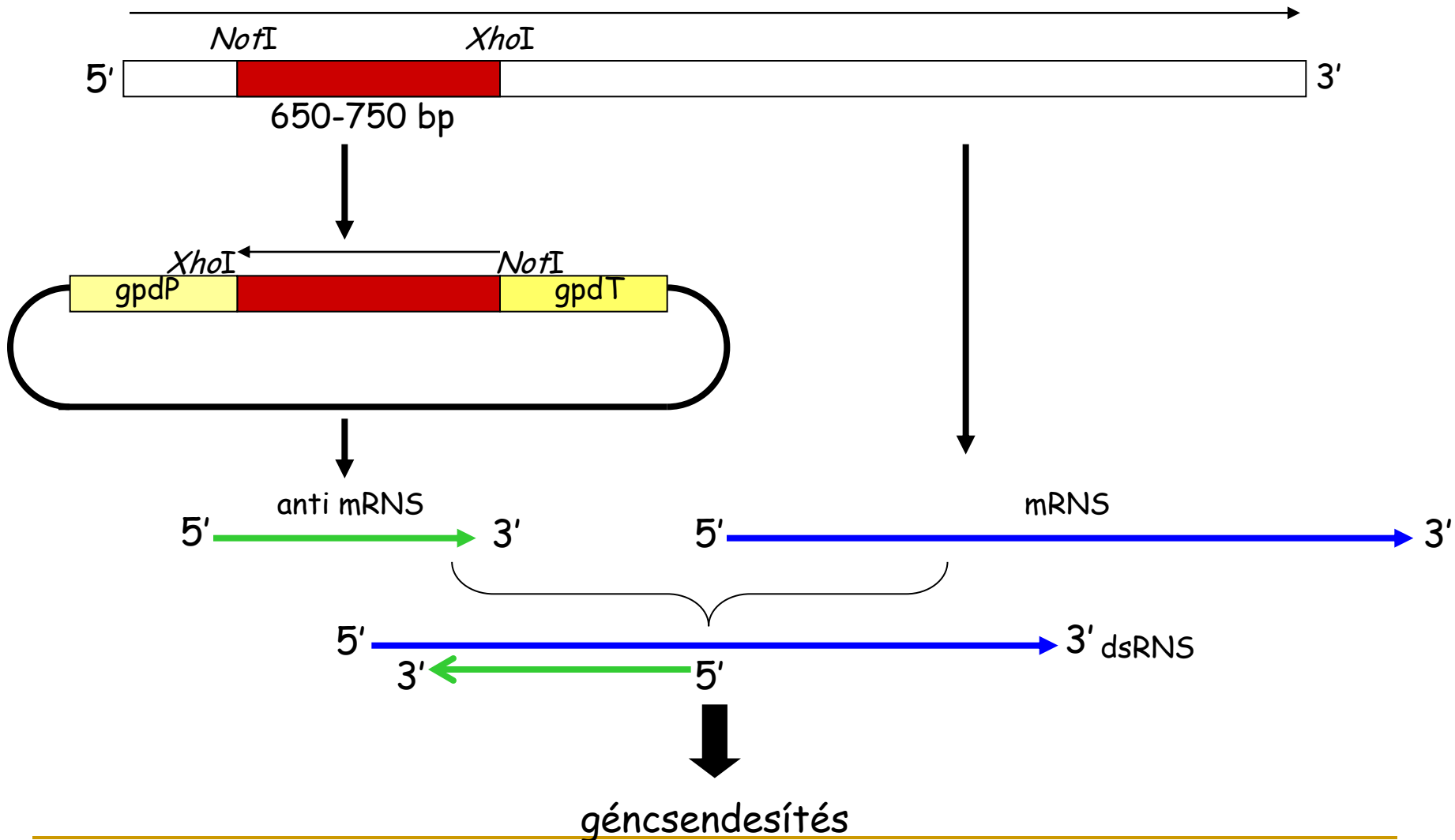


Sztatinok hatása a transzformánsokra

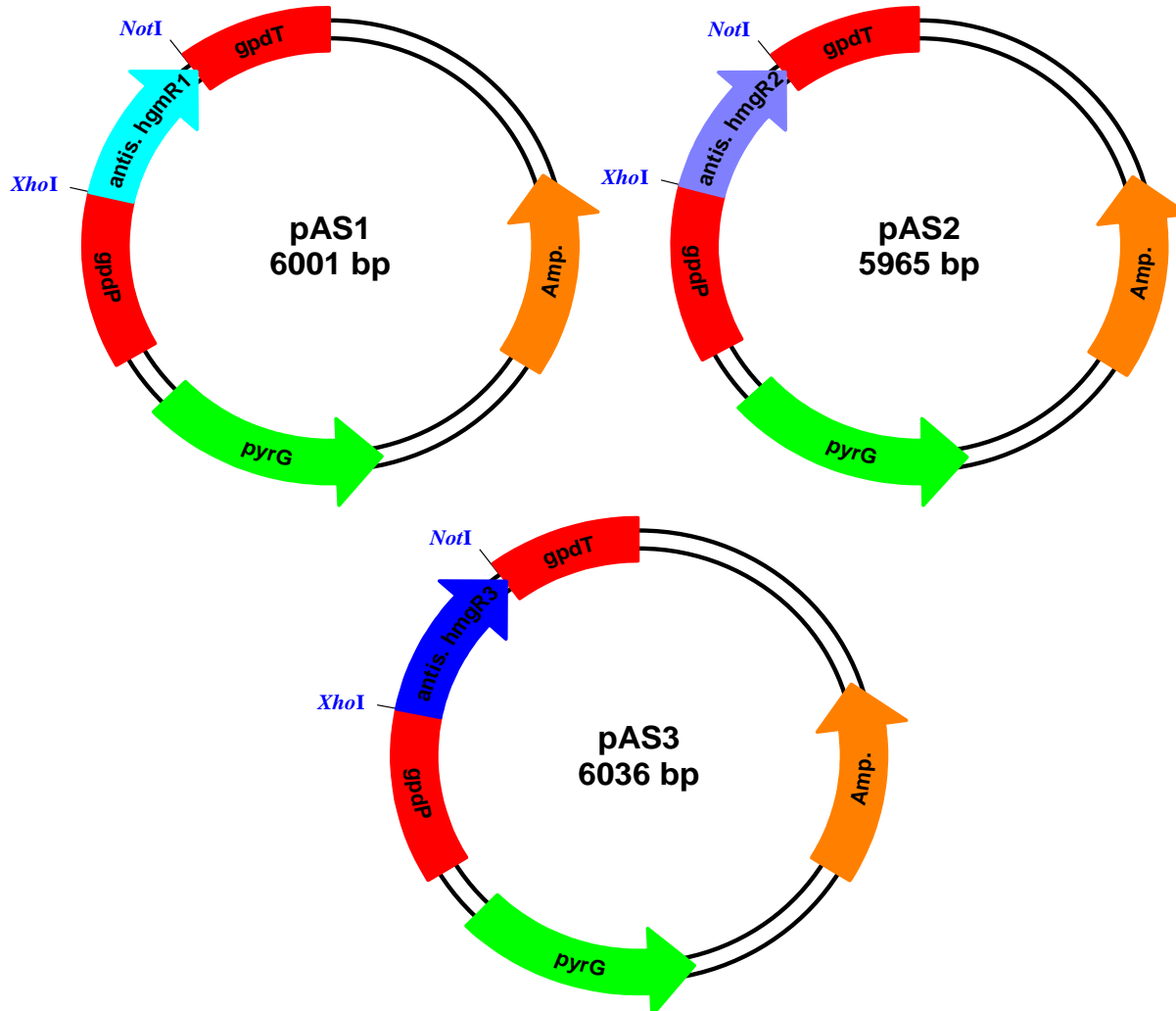
törzs/sztatin	Fluvasztatin	Atorvasztatin	Rozuvasztatin
MS12	2-4	16	32
MS12+pNG1	2-4	16	32
MS12+pNG2	16-32	128-256	>256
MS12+pNG3	32-64	>256	>256

Minimális gátló koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)

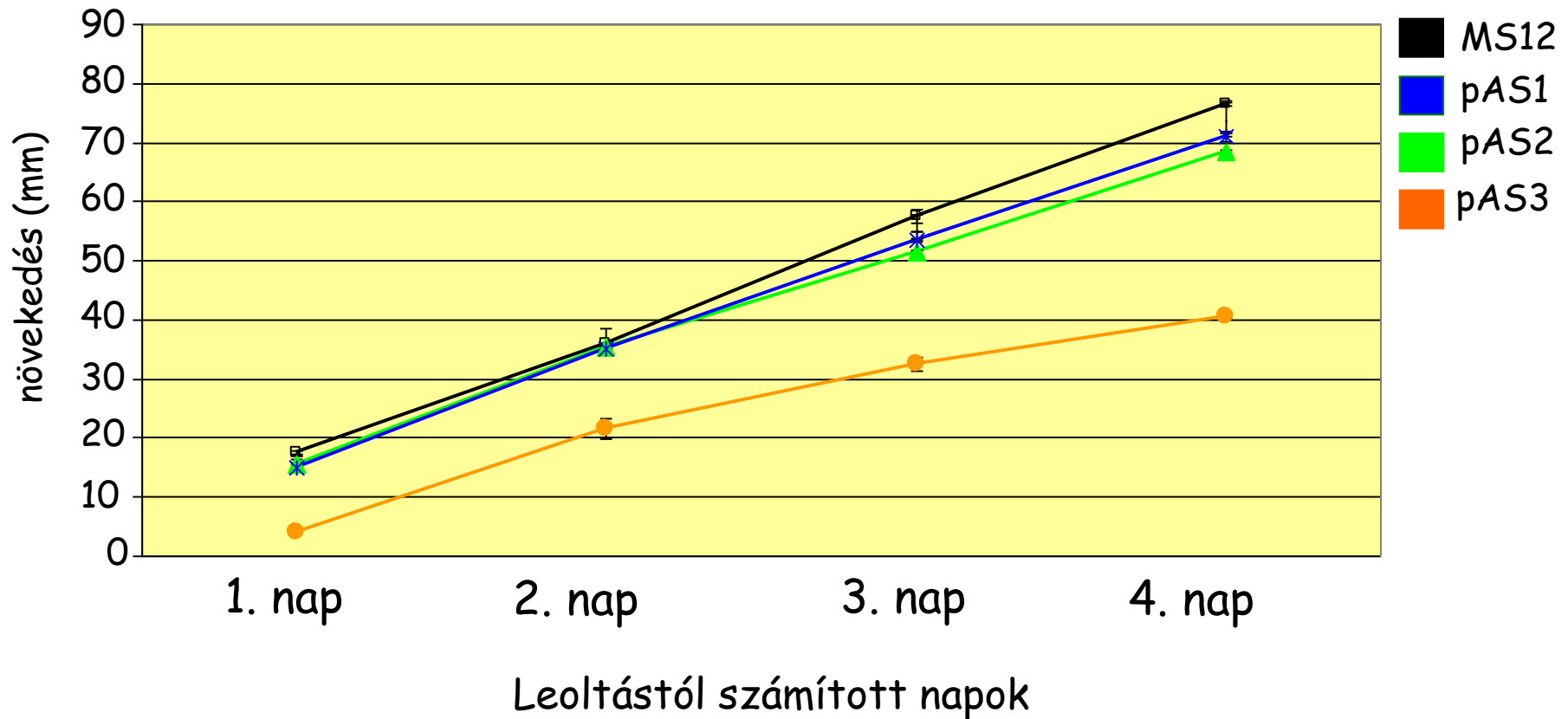
A gének csendesítése



Transzformáló vektorok

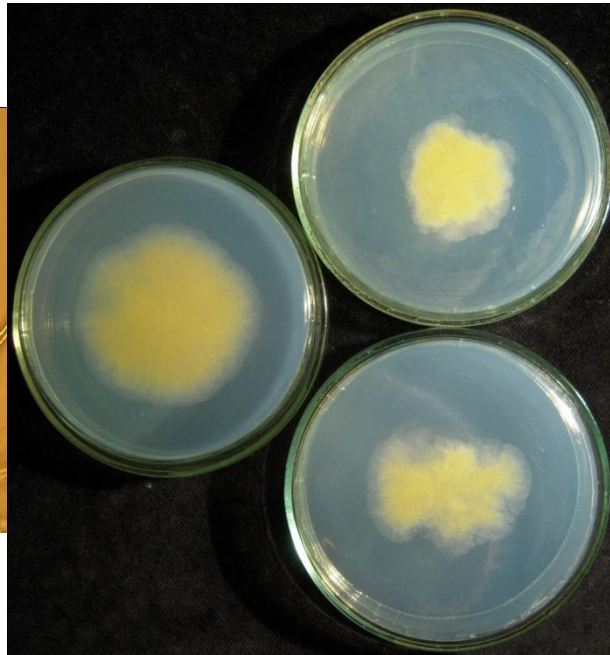
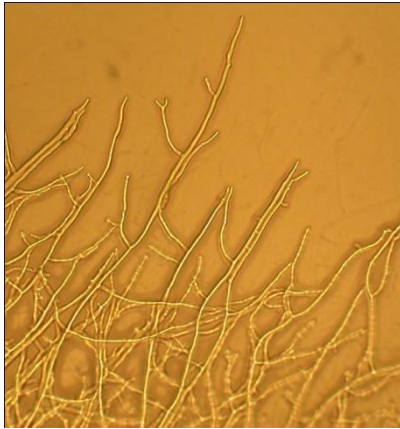


A kapott transzformánsok jellemzése

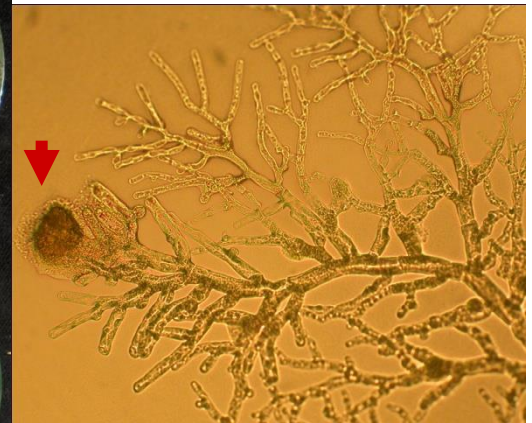


A pAS3 vektor hatása

MS12



pAS3-3



pAS3-4

- csírázás
- növekedés
- sejtmag

Folyamatban lévő munkák és további tervek

- a kapott transzformáns törzsek jellemzése
 - GFP
 - a fő szterolkomponens (ergoszterol) mennyiségének HPLC-s mérése
 - egyéb, az izoprén bioszintézis útról leágazó, termékek HPLC-s meghatározása
-

Összefoglalás

- megvizsgáltuk a gének kifejeződését különböző tenyésztési körülmények között
 - klónoztuk a géneket, expressziós vektorokat hoztunk létre
 - jellemeztük a transzformánsokat
 - összkarotin tartalom, sztatinnal szembeni érzékenység vizsgálata
 - megkezdtük a gének további funkcionális vizsgálatát
 - hmgR2 általános izoprén bioszintézisért felelős
 - hmgR3 karotinbioszintézis, morfogenezis, oxigén érzékelése
-

Köszönetnyilvánítás

- Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba
 - Dr. Papp Tamás
 - Dr. Csernetics Árpád
 - Dr. Szekeres András
 - Bencsik Ottó
 - Farkas Anita
 - a 309-s labor dolgozói
 - az SZTE-TTIK Mikrobiológiai Tanszék valamennyi munkatársa
-



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Köszönöm a figyelmet!

- Jelen kutatási eredmények megjelenését „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának kiszélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos utánpótlás biztosításával” című, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 azonosítószámú projekt támogatja. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.